OPIATREZEPTOREN DER LANGERHANSSCHEN INSEL: BEDEUTUNG BEI DER REGULATION DER GLUCOSE-VERMITTELTEN INSULINSEKRETION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
URSULA MARIA BERGER
aus Coburg

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546526_0001

OPIATREZEPTOREN DER LANGERHANSSCHEN INSEL: BEDEUTUNG BEI DER REGULATION DER GLUCOSE-VERMITTELTEN INSULINSEKRETION

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
URSULA MARIA BERGER
aus Coburg

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 1985

Dekan: Prof. Dr. K.-A. Kovar

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1982 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Dezember 1984 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon danke ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E.J. Verspohl für die ständige Diskussionsbereitschaft und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

A B K Ü R Z U N G E N

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Arg	Arginin
ß-LPH	ß-Lipotropin
Ci	Curie
CLIP	corticotropin-like intermediate peptide
cpm	counts per minute (geräteabhängig gemessenes Äquivalent der radioaktiven Zerfälle)
DADLE	D-Ala^2-D-Leu^5-Enkephalin
DAMME	D-Ala^2,MePhe^4,Met(o)ol (Met-Enkephalin-analogon
DC	Dünnschichtchromatogramm
DHM	Dihydromorphin
dpm	disintegration per minute (radioaktive Zerfälle pro minute)
ESCR	external standard channel ratio
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KRB	Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molar
mCi	Milli-Curie
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute(n)

ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	millimol
η	efficiency
MSH	Melanocyten stimulierendes Hormon
n	Anzahl der Versuche
n.s.	nicht signifikant
p	probability
PP	pancreatic polypeptide
Phe	Phenylalanin
pmol	picomol
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PPO	2,5-Diphenyloxazol
s.c.	subcutan
SEM	standard error of the mean
SKF 10047	N-Allylnormetazocin
TDM	4,4'-Tetramethyldiamino-diphenyl-methan Reagens
Tyr	Tyrosin

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Geschichtlicher Überblick	1
1.2.	Opiatrezeptoren und ihre endogenen Liganden	3
1.2.1.	Biosynthese der Opioidpeptide	3
1.2.2.	Andere natürlich vorkommende Peptide mit Opiat-aktivität	4
1.2.3.	Strukturelle Analogie zwischen Endopioide und Morphinderivaten	4
1.2.4.	Metabolisierung der Enkephaline	5
1.2.5.	Opiatrezeptoren	6
1.2.5.1.	Charakterisierung verschiedener Opiatrezeptor-klassen	6
1.2.5.2.	Modellvorstellung zum Opiatrezeptor	7
1.3.	Wirkungen von Opioiden auf das endokrine Pankreas	8
1.3.1.	Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Opioiden und Pankreassekretion	8
1.3.2.	Nachweis endogener Opioide im Pankreas und in Langer-hansschen Inseln verschiedener Spezies'	9
1.3.3.	Beeinflussung der endokrinen Pankreassekretion durch Opioide	11
1.3.3.1.	Humanversuche	11
1.3.3.2.	In vitro-Untersuchungen	11
1.3.3.3.	Opioidwirkung auf die Sekretion von Insulin	13
1.3.3.4.	Mögliche Erklärungen für die widersprüchlichen Wirkungen von Enkephalinen und Morphin auf die Insulinsekretion	13
1.3.4.	Mögliche Wirkungsmechanismen, die zu einer Insulin-sekretion durch Opioide führen	15
1.3.4.1.	Kurzer Überblick über Regulationsmechanismen der Sekretion von Hormonen	15
1.3.4.2.	Beeinflussung der Sekretion von Inselhormonen	15
1.3.4.3.	Mechanismen, über die Opioide die Insulinsekretion beeinflussen	16
1.3.5.	Regulation der Somatostatinsekretion durch Opioide	17
1.3.5.1.	Vorkommen und Wirkung von Somatostatin	17
1.3.5.2.	Wirkung von Enkephalinen und Morphin auf die Sekretion von Somatostatin	18
1.4.	Fragestellung	20
2.	MATERIAL	
2.1.	Versuchstiere	22
2.2.	Chemikalien	22

2.3.	Lösungen	24
2.3.1.	Hanks' Lösung	24
2.3.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	24
2.3.3.	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	26
2.3.4.	Cysteaminlösungen	26
2.3.5.	Szintillator auf Toluolbasis	26
2.3.6.	Inkubationsmedien (für Untersuchungen zur Insulinsekretion)	26
2.3.6.1.	Vorinkubationslösung	26
2.3.6.2.	Hauptinkubationslösung	27
2.4.	Filter	27
2.5.	Geräte	28
3.	METHODEN	29
3.1.	Überprüfung der radiochemischen Reinheit	29
3.1.1.	(Tyrosyl-3,5-^{3}H)-Enkephalin(5-L-Methionin)	29
3.1.2.	^{3}H-Morphin	30
3.2.	Dünnschichtchromatogramm von nicht markiertem Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME	31
3.3.	Isolierung der Langerhansschen Inseln	35
3.4.	Vorinkubation	36
3.4.1.	Vorinkubation der Inseln für die Insulinsekretion	36
3.5.	Durchführung der Bindungsstudien	37
3.5.1.	Vorgehen	37
3.5.2.	Quenchkorrektur in Theorie und Praxis	38
3.5.3.	Auswertung: Berechnung der Zählausbeute und Aktivität	40
3.5.4.	Spezifische/unspezifische Bindung Messung und Berechnung	41
3.5.5.	Auswahl des Filtermaterials	42
3.5.6.	Auswahl des Auswaschvolumens	42
3.5.7.	ph-Einstellung	43
3.6.	Durchführung der Versuche zur Insulinsekretion	43
3.6.1.	Versuchsbedingungen	43
3.6.2.	Bestimmung der Insulinsekretion der Inseln	44
3.7.	Versuche mit Cysteamin	46
3.8.	Statistische Auswertung	47

4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	^{3}H-Met-Enkephalinbindung	48
4.1.1.	Temperaturabhängigkeit	48
4.1.2.	Zeitabhängigkeit	48
4.1.3.	Verdrängung durch unmarkierte Opioid-Analoga	52
4.1.3.1.	durch Met-Enkephalin	52
4.1.3.2.	durch Leu-Enkephalin	55
4.1.3.3.	durch DAMME	58
4.2.	Bindung von ^{3}H-Morphin in Abhängigkeit von der ^{3}H-Morphinkonzentration	61
4.3.	Insulinsekretion	64
4.3.1.	Einfluß von Met-Enkephalin	64
4.3.2.	Einfluß von Leu-Enkephalin	67
4.3.3.	Einfluß von DAMME	70
4.3.4.	Einfluß von Morphin	73
4.4.	Cysteaminversuche	76
4.4.1.	Wirkung (Theorie)	76
4.4.2.	Einfluß der Cysteaminvorbehandlung auf die glucose-induzierte Insulinsekretion	77
4.4.3.	Einfluß von verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen auf die Insulinsekretion	78
5.	DISKUSSION	80
5.1.	Opioidrezeptor-Bindung und ihre Zuordnung zu bestimmten Rezeptortypen in der Literatur	80
5.1.1.	Klassifizierung von nur zwei Opioidrezeptoren: einem Morphin- und einem Enkephalinrezeptor	80
5.1.2.	Biochemische Charakterisierung weiterer Opioid-rezeptorklassen	81
5.1.3.	Nomenklatur der Opioidrezeptoren	82
5.1.4.	Spezies- und Organunterschiede	84
5.1.5.	Bedeutung für die eigene Arbeit	85
5.2.	Vergleich von Bindungseigenschaften und Insulin-sekretionsstudien verschiedener Enkephaline und Morphin an Inseln	86
5.2.1.	Met-Enkephalin	86
5.2.2.	Leu-Enkephalin	91
5.2.3.	DAMME (proteolysestabiles Met-Enkephalinanalogon)	95
5.2.3.1.	Interpretation der Bindungs- und Sekretionsdaten von DAMME	95
5.2.4.	Morphin	97

5.3. Wirkungsmechanismus: direkter oder indirekter (Somatostatin-vermittelter) Effekt der Enkephaline auf die Insulinsekretion 99

5.4. Physiologische Bedeutung der Enkephaline für die Insulinsekretion 100

6. ZUSAMMENFASSUNG 102

6.1. Fragestellung 102
6.2. Ergebnisse und Schlußfolgerungen 102

7. LITERATURVERZEICHNIS 105

1. EINLEITUNG

1.1. Geschichtlicher Überblick

1973 gelang es den 3 Arbeitsgruppen von Simon, Snyder und Terenius, unabhängig voneinander, Opioid-Rezeptoren im ZNS von Tieren und Mensch durch Bindungsstudien mit Tritium-markierten Opiaten nachzuweisen (Überblick bei Simon, E. J., 1981; 1982). Die gemessene Bindung zeichnete sich durch Strukturabhängigkeit, Stereospezifität, Sättigbarkeit und Reversibilität aus. Vermutet wurde eine physiologische Bedeutung dieser Rezeptoren; sie fand ihre Bestätigung in der Entdeckung von endogenen Opiaten: 1975 gelang es Hughes, J. und Mitarbeitern, endogene Stoffe aus Schweinehirnextrakten zu identifizieren, die mit dem Opioid-rezeptor interagieren; es handelte sich dabei um Methionin- (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) und Leucin-Enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), zwei Pentapeptide, die sich nur in der C-terminalen Aminosäure-gruppe voneinander unterscheiden (Hughes, J. et al., 1975). Ihre Beobachtung, daß die Sequenz von Met-Enkephalin in der Struktur von ß-Lipotropin, einem Peptid aus 91 Aminosäuren, enthalten ist, führte zu der in Abb. 1.1 gezeigten Entdeckung der "Opioid-Familie".

Die verschiedenen Wirkungen der Opiate sowie der Nachweis unterschiedlicher endogener Liganden ließ auf die Existenz verschiedener Rezeptortypen schließen. Erstmals postulierte Martin, W.R. aufgrund pharmakologischer Untersuchungen am spinalisierten Hund (Rückenmark durchtrennt) drei verschiedene Bindungsstellen, die

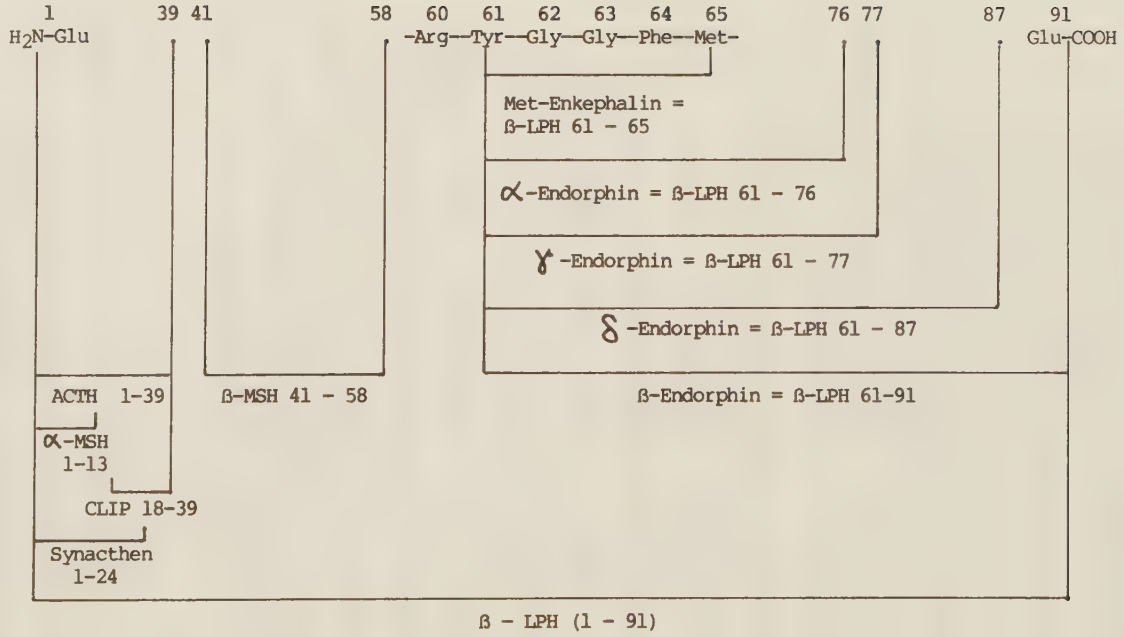

Abb. 1.1: Opioidpeptide als Segmente aus dem ß-Lipotropin

Die Abbildung gibt die einzelnen Sequenzen der bekannten Opioidpeptide als Segmente aus dem ß-Lipotropin (ß-LPH) wieder. Die Aminosäuresequenz 61 - 65 stellt das Pentapeptid Met-Enkephalin dar. Sie ist allen Opioiden gemeinsam.

nach ihren bevorzugten Bindungspartnern als μ- (Morphin), κ- (Ketocyclacocin) und σ- (SKF 10047) Rezeptor bezeichnet wurden (Martin W.R. et al., 1976). Befunde von Lord, J.A.H. et al., 1977 konnten schließlich zeigen, daß für Enkephaline neben dem μ-Rezeptor eine höher affine Bindungsstelle existiert, die als δ-Rezeptor bezeichnet wurde.

1.2. Opiatrezeptoren und ihre endogenen Liganden

1.2.1. Biosynthese der Opioidpeptide

Neuere Erkenntnisse ergaben, daß die Enkephaline nicht von dem aus der Hypophyse stammenden ß-Lipotropin abstammen (Chung, A. C. und Goldstein, A., 1976). Met- und Leu-Enkephalin, sowie 16 weitere Opioidpeptide leiten sich von nur 3 Präkursoren ab, in deren Molekülen mehrere (Met- und Leu-) Enkephalineinheiten enthalten sind. Diese 3 Präkursoren sind das Pro-Enkephalin, das Pro-Opiomelanocortin (POMC) und das Pro-Dynorphin (Cox, B.M., 1982; Bloom, F.E., 1983; Weber, E. et al., 1983; Lewis, R.V. und Stern A.S., 1983; Morley, J.S., 1983). Die Bildung der opiataktiven Peptide erfolgt durch enzymatische Spaltung an benachbarten basischen Aminosäuren (Arg oder Lys); Trypsin und eine Carboxypeptidase werden hier wirksam (Hook, V.Y.H. et al., 1982). Pro-Enkephalin ist Präkursormolekül für Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und weiteren am C-terminalen Ende verlängerten Peptiden (Gubler, U. et al., 1982). ß-Endorphin und ACTH werden aus POMC freigesetzt, Dynorphin und Leu-Enkephalin aus dem Pro-Dynorphinmolekül (Kakidani, H. et al., 1982). Da der Proteolyse-

vorgang in verschiedenen Geweben unterschiedlich geregelt ist, kann es lokal zu einem vielfältigen Verteilungsmuster kommen. Die Opiataktivität ist auf diese Weise gewebespezifisch regulierbar (Weber, E. et al., 1983).

1.2.2. Andere natürlich vorkommende Peptide mit Opiataktivität

In diese Gruppe gehören das Dermorphin, ein aus der Froschhaut isoliertes Peptid, die Casomorphine, auch als Exorphine bezeichnet, da sie aus dem Casein der Milch extrahiert wurden (Zioudrou, Ch. et al., 1979; Brantl, V. et al., 1979) und Kyotorphin, ein aus Rinderhirn isoliertes Dipeptid (Überblick bei Cox, B.M., 1982; Bloom, F.E., 1983; Morley, J.S., 1983).

1.2.3. Strukturelle Analogie zwischen Endopioiden und Morphinderivaten

Allen opiataktiven Peptiden ist die N-terminal gelegene Met-Enkephalin- bzw. Leu-Enkephalin-Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe- gemeinsam und damit ein Tyrosinrest in N-terminaler Position. Im Tyrosinrest liegt die auf den ersten Blick nicht zu erkennende Strukturgemeinsamkeit der Opioide mit dem Morphinmolekül. Diese Strukturanalogie zu den Morphinderivaten erklärt wahrscheinlich die stereospezifische Bindung an identische Rezeptorproteine (Horn, A.S. und Rodgers, J.R., 1977; Höltje, H.-D., 1982). Fehlt der Tyrosinrest, entstehen biologisch inaktive Tetrapeptide (Konturek, S.J., 1980). (Abb. 1.2 Strukturanalogie Enkephaline -

Morphin - Naloxon).

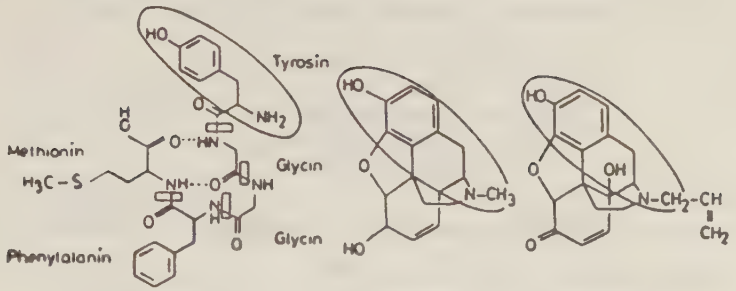

Abb. 1.2: Strukturelle Ähnlichkeit von Met-Enkephalin, Morphin und Naloxon

1.2.4. Metabolisierung der Enkephaline

Bei der Metabolisierung der Enkephaline spielen 3 Enzyme (Abb. 1.3), die an Gehirnpräparationen untersucht wurden, eine wichtige Rolle (Hughes, J., et al., 1980; Schwartz, J.-C. et al., 1983):

- Eine unspezifische Aminopeptidase:

Sie spaltet den N-terminalen Tyrosinrest ab.

- Eine spezifische Dipeptidyl-Carboxypeptidase ("Enkephalinase"):

Sie spaltet die Bindung Gly^3-Phe^4. Es ist eine membranständige Peptidase, die im synaptischen Spalt in unmittelbarer Nähe der Opiatrezeptoren lokalisiert ist. Auch Angiotensin-converting-Enzym hydrolisiert diese Bindung.

- Eine Dipeptidyl-Aminopeptidase:

Sie spaltet das Fragment Tyr-Gly von Enkephalinen ab.

Durch jede dieser enzymatischen Spaltungen entstehen wirkungslose Fragmente.

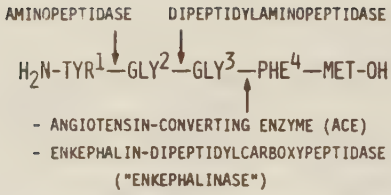

Abb.1.3: Verschiedene Wege des enzymatischen Met-Enkephalin-Abbaus (Schwartz, J.-C. et al., 1981).

1.2.5. Opiatrezeptoren

1.2.5.1. Charakterisierung verschiedener Opiatrezeptorklassen

Der experimentelle Beweis von der Existenz multipler Rezeptorpopulationen gelang mit Hilfe von in vitro Bindungsstudien und der Nicht-Selektivität bzw. der Kreuzreaktivität im Test. Bislang wurden 5 Rezeptorunterklassen definiert, die als μ-, δ-, ε-, σ- und κ-Rezeptoren bezeichnet werden (Tab 1.1: Opiatrezeptortypen). Ihre endogenen Bindungspartner sind:

- die Pro-Enkephalinderivate für δ-Rezeptoren
- die Pro-Dynorphinderivate für κ-Rezeptoren
- ß-Endorphin für ε-Rezeptoren.

Ein Nachteil für die Beurteilung aller Untersuchungen ist, daß keiner der Liganden eine absolute Spezifität für nur eine Bindungsstelle besitzt. Alle binden mit bevorzugter Affinität an "ihren" Rezeptor, zeigen aber auch Kreuzreaktionen mit den anderen Opioidbindungsstellen (Paterson, S.J. et al., 1983).

Rezeptortyp	zuerst nachgewiesen in	bevorzugte Liganden
μ-Rezeptor	ZNS, Meerschwein-Ileum	Morphin
δ-Rezeptor	Vas deferens (Maus)	Enkephaline
ε-Rezeptor	Vas deferens (Ratte)	ß-Endorphin
σ-Rezeptor	ZNS	SKF 10047
κ-Rezeptor	ZNS, Vas deferens (Maus)	Ketocyclazocin

Tab. 1.1: Opiatrezeptor-Typen und ihre bevorzugten Bindungspartner (Übersicht bei Blume, H., 1982)

1.2.5.2. Modellvorstellung zum Opiatrezeptor

Die Opiatrezeptoren sind membrangebundene Proteine und tragen eine für die Funktion notwendige SH-Gruppe (Pasternak, G.W. und Snyder, S.H., 1974; Pasternak, G.W. et al., 1975). Sie haben die Eigenschaft, in Abhängigkeit von der jeweils vorliegenden Natriumkonzentration ihre Konformation zu ändern. Damit ändert sich auch die Bindungsaffinität für Opiatagonisten bzw. -antagonisten (Simantov, R. und Snyder, S.H., 1976; Terenius, L. und Wahlström, A., 1976; Barnard, E.A. und Demoliou-Mason, C., 1983). Natriumionen werden reversibel an den Rezeptor gebunden und er-

höhen seine Affinität für Antagonisten. In der Na-freien Form werden bevorzugt Agonisten gebunden.

Aus dem heterogenen Verteilungsmuster der verschiedenen Opioidbindungsstellen in Geweben und aus den unterschiedlichen Affinitäten von Opioidpeptiden zu den Rezeptorklassen resultiert das unübersichtliche und wenig systematische Wirkungsspektrum der Opioide.

1.3. Wirkungen von Opioiden auf das endokrine Pankreas

1.3.1. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Opioiden und Pankreassekretion

Das Wissen um den hyperglykämischen Effekt von Morphin reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück (Übersicht in Giugliano, D., 1984) und konnte durch neuere Untersuchungen von Feldberg W. et al. als ein über das Zentrale Nervensystem vermittelter Effekt bestätigt werden (Feldberg, W. und Shaligram, S.V., 1972; Feldberg, W. und Gupta, K.P., 1974). Bei Heroinabhängigen, ähnlich wie bei Nicht-Insulin-abhängigen-Diabetikern konnte eine verschlechterte Insulinsekretion nach Glucosebelastung beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Nicht-Insulin-abhängigen-Diabetes und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Enkephalinen wurde von Leslie, R.D.G. et al., 1979 festgestellt. Vermutet wird, daß körpereigene Opioide eine Rolle in der Pathogenese des Nicht-Insulin-abhängigen-Diabetes spielen (Mason, J.S. und Heber, D.,

1982; Giugliano, D. et al., 1982; Giugliano, D., 1984).

1.3.2. Nachweis endogener Opioide im Pankreas und in Langerhansschen Inseln verschiedener Spezies'

Die Vermutung, daß Opioide die Funktionen des endokrinen Pankreas nicht nur über zentrale Effekte, sondern auch lokal beeinflussen könnten, wurde durch den Nachweis opiataktiver Substanzen in Pankreasgewebe und Langerhansschen Inseln verschiedener Spezies genährt. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengestellt:

a) Nachweis opiataktiver Substanzen im Pankreas

1. ß-Endorphin und ß-endorphinähnliche Polypeptide wurden im Pankreas des Menschen (Bruni, J.F. et al., 1979) und im Schweinepankreas (Houck, J.C. et al., 1981) nachgewiesen.

2. Im Meerschweinchen-Pankreas fanden Stern, A.S. et al., 1982 hochmolekulare enkephalinenthaltende Polypeptide, sowie freies Met- und Leu-Enkephalin. Auch im Human-Pankreas konnten Enkephaline (Polak, J.M. et al., 1977; Feurle, G.E. et al., 1982) identifiziert werden.

3. ACTH, das wie ß-Endorphin und ß-Lipotropin aus POMC freigesetzt wird, wurde in Inseln der Ratte gefunden (Sanchez-Franco, F. et al., 1981).

b) Nachweis opiataktiver Substanzen in A, D und PP-Zellen Langerhansscher Inseln

1. Endorphinähnliche Substanzen konnten in A-Zellen Langerhansscher Inseln der Ratte nachgewiesen werden (Grube, D. et al., 1978).

2. Untersuchungen von Watkins W.B. et al. ergaben, daß ß-Endorphin in den D-Zellen Langerhansscher Inseln der Ratte, des Meerschweinchen und des Menschen lokalisiert ist. Met-Enkephalinähnliche Substanzen wurden in den D-Zellen des Hunde- und Affenpankreas gefunden (Watkins, W.B. et al., 1980).

3. ACTH-, α-MSH- und Enkephalin-Immunoreaktivität wurde in PP-Zellen von Ratte, Hund und Mensch entdeckt (Grube, D. und Forssman, W.G., 1979; Grube, D. und Weber, E., 1979; Larsson, L.-J., 1977), ß-Endorphin in PP-Zellen der Eidechse (El Salhy, M. und Grimelius, L., 1981).

c) Dynorphin, ß-Endorphin und Leu-Enkephalin werden vom isolierten perfundierten Rattenpankreas unter basalen Bedingungen und auf Glucose- und Argininreiz freigesetzt (Sachse, G. et al., 1980; 1981; 1981 a).

Diese Befunde lassen die Vermutung berechtigt erscheinen, daß Opioide direkt die Funktionen des endokrinen Pankreas beeinflussen können. Welche Rolle sie bei der Regulation der Hormonsekretion spielen wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht.

1.3.3. Beeinflussung der endokrinen Pankreassekretion durch Opioide

1.3.3.1. Humanversuche

Untersuchungen an Menschen zeigten, daß Opioidpeptide die endokrine Pankreassekretion beeinflussen. DAMME führt dabei zu keiner signifikanten Veränderung der basalen Insulin-, Glukagon- und Glucosewerte im Blut (Stubbs, W.A. et al., 1978; del Pozo, E. et al., 1980; Gilchrist, N. et al., 1983), dagegen kommt es nach intravenöser und oraler Glucosebelastung zu einer Hemmung der Insulin- und Glukagonsekretion durch DAMME und zu einer Verschlechterung der Glucosetoleranz (Jeanrenaud, X. et al., 1983). Nach i.v. Bolus von ß-Endorphin zeigten sich bei gefasteten Testpersonen erhöhte Plasmainsulin-, Glukagon- und Blutglucosewerte (Reid, R.L. und Yen, S.S.C., 1981), nach i.v. Applikation von Naloxon wurden die basalen Seruminsulinspiegel geringfügig angehoben, die Glucosewerte blieben unbeeinflußt (Morley, J.E. et al., 1980).

Diese Versuche weisen auf eine Bedeutung der endogenen Opioide bei der Kohlenhydratmetabolisierung und eventuell bei der Entwicklung von Störungen der Glucosetoleranz hin (Jeanrenaud, X. et al., 1983).

1.3.3.2. In vitro-Untersuchungen

Bisherige Untersuchungen an verschiedenen in vitro Modellen zeigten, daß sowohl endogene Opioide als auch exogene Opiate die

Hormonsekretion Langerhansscher Inseln direkt beeinflussen. Erste Versuche mit Morphin und ß-Endorphin am isolierten perfundierten Hundepankreas führten zu einer erhöhten Freisetzung von Insulin und Glukagon und zu einer Verringerung der Somatostatinsekretion. Mit dem Opiatantagonisten Naloxon waren diese Effekte blockierbar (Ipp, E. et al., 1978).

1980 zeigten Kanter, R. A. et al. eine dosisabhängige Hemmung der Insulin- und Glukagonsekretion durch verschiedene Enkephaline, Morphin dagegen stimulierte beides. In Gegenwart von Naloxon wurden die Effekte aufgehoben.

Aus zahlreichen weiteren Untersuchungen insbesondere zur Insulinsekretion läßt sich, trotz einiger gegenteiliger Befunde, folgende Tendenz ablesen:

Die Wirkung der Opioide auf die Insulinsekretion kann vom stimulierenden bis zum hemmenden Effekt variieren, je nach Konzentration des eingesetzten Opioids. So können die Opioide und Morphin bei mikromolaren oder höheren Konzentration die Insulinsekretion hemmen (Green, I.C. et al., 1980; Ryder, S. et al., 1980 ; Sachse, G. et al., 1981 a; Nieter, M. und Schatz, H., 1981) oder unbeeinflußt lassen (Pierluissi, R. et al., 1981; Nieter, M. und Schatz, H., 1981), wogegen bei niedrigeren Konzentrationen ß-Endorphin, verschiedene Enkephaline und Morphin die Insulinsekretion stimulieren (Ipp, E. et al., 1978; Green, I.C. et al., 1980; Pierluissi, R. et al., 1981; Sachse, G. et al., 1981a). Diese unterschiedlichen Wirkungen der Opioide deuten auf verschiedene Opiatrezeptoren in Langerhansschen Inseln (Green I.C. et al., 1983; Schusdziarra, V. et al., 1983).

1.3.3.3. Opioidwirkung auf die Sekretion von Insulin

Die bisher in der Literatur veröffentlichen Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der Insulinsekretion durch Enkephaline, Endorphine und Morphin sind in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

1.3.3.4. Mögliche Erklärungen für die widersprüchlichen Wirkungen von Enkephalinen und Morphin auf die Insulinsekretion

Bei der Beurteilung der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse aus Tabelle 1.2 muß berücksichtigt werden, daß bei den verschiedenen Autoren methodische Unterschiede vorlagen: die Versuche wurden an Kollagenase-isolierten Inseln (Green, I.C. et al., 1980; 1981; 1983; Ryder, S. et al., 1980; Nieter, M. und Schatz, H., 1981;) bzw. an kultivierten Inseln (Kanter, R. A. et al., 1980; Pierluissi, R. et al., 1981) und am isolierten perfundierten Pankreas (Ipp, E. et al., 1978; Hermansen K., 1983) durchgeführt. Verschiedene Glucosekonzentrationen, unterschiedliche Opioidkonzentrationen und Opioidderivate sowie Speziesunterschiede (Tab. 1.2 zu entnehmen) spielen als Gründe für die teilweise konträren Befunde zu den Opioid- und Morphinwirkungen eine wichtige Rolle.

Met-Enkephalin	Leu-Enkephalin	D-ala^2-Leu-enkephalin	DAMME	Morphin	ß-Endorphin	Naloxon	Tierspezies/ Testsystem	Erstautor/ Jahr
				$3x10^{-6}$ M ↑ (5,5 mM)	$5,4x10^{-9}$ M ↑ (5,5 mM)	blockiert die Effekte	isolierter perfundierter Hundepankreas	Ipp,E., 1978
$1,2x10^{-8}$ – $1,2x10^{-6}$ M dosisabhängig ↓ (16,5 mM)				$2x10^{-5}$ M ↑ (Arg 10 mM) (5,5 mM)		"	monolayer Inselzell-kultur / Ratte	Kanter, R.A., 1980
10^{-9}–1,6x 10^{-7} M ↑ (8 mM)			10^{-10}–10^{-8} M ↑ 10^{-5} M ↓ (8 mM) dosisreversibel	$5x10^{-7}$M ↑ $6,5x10^{-5}$ M ↓ (8 mM)		" 10^{-6} M ↑	isolierte Inseln Ratte	Green, I.C., 1980
			$1,7$–$8,3x10^{-8}$ M ↑ (5 mM, 7mM) $3,3x10^{-6}$ M – (5 mM)			hebt die Effekte auf	kultivierte Inseln Ratte	Pierluissi, R., 1981
				$5x10^{-5}$ M ↓ (5,5 mM) (Arg 10 mM)			isolierte Inseln Ratte	Ryder, S., 1980
$2x10^{-6}$ M ↑ (50 mg%)			$2x10^{-6}$ M – (50 mg%) $2x10^{-5}$ M ↓ (200 mg%)		10^{-8} M –	kein Eigen-effekt 10^{-5} M	isolierte Inseln Ratte	Nieter, M. 1981
	$2,9x10^{-9}$/ $2,9x10^{-8}$ M (300 mg%) ↑				$2,9x10^{-10}$ M – $2,9x10^{-8}$ M (300 mg%) ↓	$2,9x10^{-6}$ M hebt Effekt nicht auf	Kaninchenpankreas	Rudman, D., 1983
10^{-8} M ↑ 10^{-6} M – (6 mM)	10^{-8} M ↑ 10^{-6} M ↑ (6 mM)				α-Endorphin $6x10^{-9}$ M ↑ 10^{-6} M – (6 mM)	10^{-7} M ↑ 10^{-6} M ↑ (6 mM)	isolierte Inseln Ratte	Green, I.C., 1983
10^{-9}–10^{-7} M ↑ (8,3 mM)				10^{-5} M ↑ (8,3 mM)		kein Eigen-effekt	isolierter perfun. Hundepankreas	Hermansen, K., 1983

Tab. 1.2: Beeinflussung der Insulinsekretion durch Opioide, Morphin und Naloxon
Die Insulinsekretion wird gesteigert (↑), gehemmt (↓), nicht beeinflußt (–); Angabe der Glucosekonzentration in Klammern.

1.3.4. Mögliche Wirkungsmechanismen, die zu einer Insulinsekretion durch Opioide führen

1.3.4.1. Kurzer Überblick über Regulationsmechanismen der Sekretion von Hormonen

Die Freisetzung hormoneller Stoffe wird von endokrinen, parakrinen und neuralen Kontrollmechanismen beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit bietet die direkte Zell-Zell-Kommunikation über sog. "gap junctions" (Hertzberg, E.L. et al., 1981).
Im Falle des endokrinen Weges werden die Hormone mit dem Blutstrom zu ihren Zielorganen transportiert. Im Gegensatz dazu kann durch parakrine Effekte eine gegenseitige Kontaktaufnahme von Zellen innerhalb eines endokrinen Organs erfolgen. Hierbei werden Stoffe einer Zelle in den interstitiellen Raum sezerniert, die dann auf die Funktionen der benachbarten Zellen Einfluß ausüben können. Ein Verbindungsglied zwischen den Cytoplasmen zweier angrenzender Zellen bilden die "gap junctions". Sie ermöglichen den interzellulären Transfer von Ionen und kleinen Molekülen.

1.3.4.2. Beeinflussung der Sekretion von Inselhormonen

Auch die Freisetzung der Inselhormone wird über diese Regulationsmechanismen kontrolliert. Da die Langerhanssche Insel aus verschiedenen endokrinen Zellen besteht und jedes Inselhormon von einem bestimmten Zelltyp sezerniert wird, liegt die Vermutung nahe, daß auch parakrine Effekte und die Zell-Zell-Kommunikation via "gap junctions" bei der Feinregulation der Sekretion dieser

Hormone eine Rolle spielen.

Hinweise auf solche Kontrollmechanismen ergaben morphologische Studien (Orci, L., 1977), sowie Untersuchungen, die die gegenseitige Beeinflussung der Sekretion von A-, B- und D-Zellen (Schatz, H. und Kullek, U., 1980; Honey, R. N. et al., 1981; Fujimoto, W.Y. et al., 1983) und die Autoregulation von B- und D-Zellen über feedback-Mechanismen (Ammon, H.P.T. und Verspohl, E., 1976; Patel, Y.C. et al., 1982; Verspohl, E. et al., 1982) zeigen konnten. Der Nachweis von spezifischen Bindungsstellen für Insulin, Glucagon und Somatostatin an A-, B- und D-Zellen gelang mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Autoradiographie. Die Rezeptordichte und das Verteilungsmuster dieser spezifischen Zelloberflächenrezeptoren korrelieren mit den bekannten Effekten dieser drei Hormone auf jede der Inselzellen (Patel, Y.C. et al., 1982). Als solche sind bisher bekannt: eine Hemmung der A- und B-Zellsekretion durch Insulin und Somatostatin (Koerker, D.J. et al., 1974; Gerich, J.E. et al., 1975; Guilleman, R. und Gerich, J.E. 1976) und eine Stimulierung der B- und D-Zellsekretion durch Glucagon (Samols, E. et al., 1965).

1.3.4.3. Mechanismen, über die Opioide die Insulinsekretion beeinflussen

Diskutiert werden folgende Möglichkeiten:

1) Ein möglicher Wirkungsmechanismus könnte die Stimulation der Insulinfreisetzung über eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration an c-AMP sein. Dieser Einfluß auf die c-AMP-Konzentration in Inseln konnte nur bei einzelnen Opiatpeptiden gezeigt werden

(Green, I. C. et al., 1981; 1983;).

2) Die Lokalisation von Met-Enkephalin in Nervenendigungen endokriner Drüsen (Schulzberg, M. et al., 1978) und der Nachweis Enkephalin-immunoreaktiver Nerven in und um Pankreasganglien (Larsson, L.-I. und Rehfeld, J. F., 1979; Larsson, L.-I., 1979) legt die Vermutung nahe, daß endogene Opiate die Inseln über Nervenbahnen erreichen. Sie könnten so die Insulin- und Glucagonfreisetzung modifizieren, indem sie direkt auf A- und B-Zellen oder indirekt über die Beeinflussung der Somatostatinfreisetzung aus D-Zellen wirken (Kanter, R.A. et al., 1980).

3) Der Nachweis von ß-Endorphin in den D-Zellen Langerhansscher Inseln (Watkins, W.B. et al., 1980) und die Verringerung der Somatostatinfreisetzung bei gleichzeitiger Stimulierung der Insulin- und Glucagonsekretion durch ß-Endorphin und Morphin (Ipp, E. et al., 1978), schließen die Möglichkeit nicht aus, daß die Erhöhung der Insulin- und Glucagonfreisetzung durch Opioide indirekt, d.h. über eine Hemmung der Somatostatinsekretion vermittelt wird.

1.3.5. Regulation der Somatostatinsekretion durch Opioide

1.3.5.1. Vorkommen und Wirkung von Somatostatin

Somatostatin, ein ursprünglich aus dem Hypothalamus isoliertes Tetradecapeptid (Brazeau, P. et al., 1973) wird in den D-Zellen des Pankreas, dem Gastrointestinaltrakt und im Gehirn gebildet. Es hemmt nicht nur die Sekretion von Wachstumshormon, sondern generell die Freisetzung von Peptidhormonen und somit auch die

Insulin und Glucagonsekretion (Alberti, K.G.M.M. et al., 1973; Honey, R.N. et al., 1981; Fujimoto, W.Y. et al., 1983). Da sich die Somatostatinsekretion mit steigenden Glucosekonzentrationen signifikant erhöhen läßt (Kanatsuka, A. et al., 1981; Patel, Y.C. et al., 1979) ist die durch Glucose induzierte Insulinsekretion von der Hemmwirkung des Somatostatins betroffen (Taniguchi, H. et al., 1977; Fujimoto, W. Y. et al., 1983).

1.3.5.2. Wirkung von Enkephalinen und Morphin auf die Sekretion von Somatostatin

An verschiedenen Tiermodellen konnte bisher gezeigt werden, daß Opioide eine inhibitorische Wirkung auf die Somatostatinsekretion ausüben. So zeigten in vivo Untersuchungen am Hundepankreas eine Hemmung der basalen Somatostatinfreisetzung durch Morphin, Leu-Enkephalin und ß-Casomorphinen (Schusdziarra, V. et al., 1983). Befunde von in vitro-Untersuchungen am isolierten Hundepankreas zeigten, daß der Steigerung der Insulinfreisetzung durch Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin (Hermansen, K., 1983), Morphin und ß-Endorphin (Ipp, E. et al., 1978) eine Hemmung der Somatostatinsekretion voranging.
Auch in anderen somatostatinhaltigen Geweben wie dem Rattenmagen, wurde ein hemmender Einfluß von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin auf die Somatostatinfreisetzung nachgewiesen (Mc Intosh, C.H.S. et al., 1983).

Diese Befunde sprechen dafür, daß für die Wirkung der Opioide an

isolierten Inseln der Ratte Somatostatin als Modulator zu berücksichtigen ist. Um die Bedeutung von Somatostatin bezüglich der Enkephalinwirkung auf die Insulinsekretion zu untersuchen, kann Cysteamin als Mittel zur Entleerung der Somatostatinspeicher eingesetzt werden. So ist es möglich den Wirkungsmechanismus der Enkephaline an der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte besser zu charakterisieren.

Der eigentliche Mechanismus, über den Opioide die Sekretionsprozesse des endokrinen Pankreas beeinflussen ist unbekannt. Die Beeinflussung der Inselzellfunktionen durch Opioide scheint aber über spezifische Opiatrezeptoren vermittelt zu werden.

1.4. Fragestellung

Trotz der häufig geäußerten Vermutung, daß die Opioide über spezifische Rezeptoren ihre biologischen Wirkungen ausüben, wurde bisher nicht systematisch untersucht, ob Opioidrezeptoren an Inseln existieren, über die modulierende Effekte auf die Sekretion von Insulin vermittelt werden.
Mit Hilfe von Opioid-Rezeptorstudien sollte in dieser Arbeit versucht werden, die oben genannten Widersprüche, soweit sie substanzspezifisch oder konzentrationsabhängig sind, zu klären.

1.) Dazu sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Opioide spezifisch an isolierte Pankreasinseln der Ratte binden. Die Bindung von ^{3}H-Met-Enkephalin und ^{3}H-Morphin sollte hinsichtlich ihrer Temperaturabhängigkeit, Zeitabhängigkeit und Sättigbarkeit untersucht werden. Mit Hilfe von Verdrängungsstudien sollten weiterhin die Bindungseigenschaften der unmarkierten Opioide Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME erfaßt werden (Spezifität der Bindung).

2.) Der Einfluß der für die Bindungsstudien eingesetzten Opioide auf die Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte sollte bei verschiedenen Glucosekonzentrationen (5,0 mM, 16,7 mM) untersucht werden.

3.) Der Vergleich von Bindungs- und Sekretionsstudien sollte zeigen, ob sich eine eventuelle Bindung mit dem biologischen Effekt korrelieren läßt.

4.) Weiterhin sollte versucht werden zu klären, ob die Enkephaline an Langerhansschen Inseln der Ratte die Insulinsekretion über eine Hemmung der Somatostatinfreisetzung beeinflussen (direkter oder indirekter Effekt).

2. M A T E R I A L

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Inseln von Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Das Körpergewicht betrug 200 bis 300 g. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24 °C und 26 °C und bei einer relativen Luftfeuchte von 55 - 65 % im 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2. Chemikalien

Bacitracin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Carbogen (95% O_2/5% CO_2)	Firma Mast, Tübingen
Collagenase	Worthington Biochem. Corp. Freehold, U.S.A., CLS grade, Typ IV
Cysteamin-HCL	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
DAMME (FK 33-824)	Sandoz AG, Nürnberg
α-D-Glucose	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F 254	Merck, Darmstadt
Ethylenglycolmonomethylether	Merck, Darmstadt
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-ethansulfonsäure)	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Insik-1 = Insulin-Radio-immunoassay-Kit:	Isotopendienst West, Sprendlingen
Leu-Enkephalin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Met-Enkephalin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Morphin	Merck, Darmstadt
^{3}H-Morphin	Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
Naloxon-HCL	Reckitt & Colman, England
Pilocarpin-HCL	Merck, Darmstadt
PPO	Merck, Darmstadt
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Rinderserumalbumin	Behringwerke AG, Marburg/Lahn
Toluol für Szintillations-zwecke	Merck, Darmstadt
(Tyrosyl-3,5-^{3}H) Enkepha-lin (5-L-Methionin)	Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig

Weitere, hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden in der jeweils reinsten Form (p.a.) von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.3. Lösungen

2.3.1. Hanks' Lösung (Hanks, J.H. und Wallace, E.R. 1949)

Zusammensetzung der Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	40,00 g
Na_2HPO_4 2 H_2O	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4$ 7 H_2O	2,00 g
$CaCl_2$ 2 H_2O	1,85 g
Aq. bidest. ad	1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt, mit 0,5 mg/ml Glucose (= 2,8 mM) und 0,2 mg/ml Rinderserumalbumin versetzt, mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.3.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB-Lösung setzt sich nach der Beschreibung von Umbreit et al., 1972 folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung wurden hergestellt:

Lösung A:

NaCl	69,20 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4$ 7 H_2O	2,93 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$	21,10 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung C:

$CaCl_2$ 2 H_2O	3,73 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor der Verwendung wurde folgende Mischung hergestellt:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Dieser Lösung wurden 2 % Rinderserumalbumin (Medium für Bindungsstudien und Untersuchungen zur Insulinsekretion) bzw. 0,2 % Rinderserumalbumin (Waschmedium in Bindungsstudien) zugegeben. Das pH wurde auf 7,35 gehalten.

2.3.3. Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Zur pH-Stabilisierung der Inkubationsmedien wurde in einigen Versuchen (siehe Legenden zu Abbildungen) die Natriumhydrogencarbonatstammmlösung der KRB-Lösung (Lösung B) durch ein entsprechendes Volumen an HEPES-Lösung (100 mM) ersetzt. Diese Krebs-Ringer-HEPES-Lösung wurde nicht begast.

2.3.4. Cysteaminlösungen

Zur oralen Vorbehandlung der Ratten wurde 1 g Cysteamin-HCl/4 ml destilliertem Wasser gelöst (Kanatsuka A. et al., 1984).

Zur Herstellung einer Cysteamin-Vorinkubationslösung wurde die Krebs-Ringer-HEPES Vorinkubationslösung mit Cysteamin-HCl 100 mg/l hergestellt (Petersson, B. und Hellerström, C., 1984).

2.3.5. Szintillatorlösung auf Toluolbasis

Toluol	1520 ml
Ethylenglycol-monomethylether	545 ml
PPO	8,2 g

2.3.6. Inkubationsmedien (für Untersuchungen zur Insulinsekretion)

2.3.6.1. Vorinkubationslösung

KRB-Lösung	2 % Rinderserumalbumin 3 mM Glucose

2.3.6.2. Hauptinkubationslösung

KRB-Lösung mit 1,5 % Rinderserumalbumin und 5,0 mM bzw. 16,7 mM Glucose.

Vor Zugabe des Rinderserumalbumins wurden die Vorinkubationslösung und die Hauptinkubationslösung 30 Minuten mit Carbogen begast.

2.4. Filter

Für die Bindungsstudien wurden Glasfasermikrofilter Whatman GF/C verwendet.

2.5. Geräte

Automatischer Gamma-Zähler Modell 4233, Nuclear Chicago Corp., U.S.A.

Beckmann Digital pH-Meter, Modell 3560, Beckmann Instruments GmbH, München

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml

F-Diluter 5203, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Laborzentrifuge UJ II KS, Heraeus Christ GmbH, Osterode

Liquid Scintillation Counter, Isocap/300 Nuclear Chicago Corp., U.S.A.

Magnetrührer, IKA-Combimag RCT, Firma Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau

Mikrocomputer, mit Disk-drive und XY-Plotter, Hewlett & Packard 9845

Plastikreagensgläser:

10,5 x 40 mm (Greiner, Nürtingen)

15 x 100 mm (Sarstedt, Nümbrecht)

Plexiglashaube zur gleichzeitigen Begasung aller Proben eines Versuches, Eigenbau

Schüttelwasserbad, Köttermann KG, Hänigsen

Stereomikroskop Modell SM 6, Nikon, Japan

Swinnex Filterhalter, 13 mm (Millipore GmbH, Neu Isenb.)

Szintillationszählfläschchen, Firma Zinsser, Frankfurt a. M.

Tischcomputer Olivetti P 602, Olivetti GmbH

Whirlmix, Vortex-Genie, Firma Wilten u. Co., Holland

3. METHODEN

3.1. Überprüfung der radiochemischen Reinheit

3.1.1. (Tyrosyl-3,5-^{3}H) Enkephalin (5-L-Methionin)

Für die Bindungsstudien wurde ein ^{3}H-markiertes Met-Enkephalin verwandt, mit einer spezifischen Aktivität von 43 Ci/mmol, einem Molekulargewicht von 577 (bei dieser Markierung) und einer radioaktiven Konzentration von 1,0 mCi/ml.

Zur Überprüfung der radiochemischen Reinheit wurden zwei Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Als Fließmittel dienten die von der Fa. Amersham Buchler angegebenen Lösungsmittelgemische:

(a) n-Butanol : Wasser : Methanol (4:3:1) (80 ml) + 2- Mercaptoethanol (0,5 ml)

(b) Ethylacetat : Pyridin : Wasser : Eisessig (100:43:25:11) + 20 mg DL-dithiothreitol

Die beiden Fließmittel trennen (Tyrosyl-3,5-^{3}H)-Enkephalin (5-L-Methionin) sowohl von seinen eigenen Zersetzungsprodukten, als auch von L-3,5-di-Jodo-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-sulfoxid, aus dem es durch katalytische Dehalogenierung mit Tritiumgas hergestellt wird. Durch Fließmittel (b) erfolgt eine Auftrennung von (Tyrosyl-3,5-^{3}H)-Enkephalin (5-L-Methionin) und seinen Sulfoxiden (s. Angaben von Amersham Buchler).

Die Substanz wurde mit Wasser (10 µl ^{3}H-Met-Enkephalin + 90 µl

H_2O) verdünnt und auf Kieselgeldünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels der Startpunkte wurden die Platten in die gesättigten Kammern eingebracht. Anschließend wurden die Platten an der Luft getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Auskratzen von 1 cm breiten Fraktionen, die dann im Flüssigszintillationszähler (Szintillatorlösung auf Toluolbasis) gemessen wurden.

Die Auswertung der Chromatogramme ergab für Laufmittel (a) einen einzigen Peak in Fraktion 4 d.h. zwischen 2,5 und 3,5 cm Wanderungsweite. In Laufmittel (b) zeigte sich neben dem ^{3}H-Met-Enkephalinpeak ein kleiner Nachpeak (siehe Abb. 3.1 Dünnschichtchromatogramme von (Tyrosyl-3,5-^{3}H)-Enkephalin (5-L-Methionin)).

3.1.2. ^{3}H-Morphin

Das bei den Rezeptorstudien eingesetzte ^{3}H-Morphin hatte eine spezifische Aktivität von 24 Ci/mmol und ein Molekulargewicht von 287. Die radioaktive Konzentration betrug 250 µCi/ml.

Um die radiochemische Reinheit zu überprüfen wurde ein Dünnschichtchromatogramm nach den Angaben des von der Firma mitgelieferten Datenblattes angefertigt.

Fließmittel: Methanol : Ammoniak (100:1,5)

Die Detektion erfolgte wie unter Pkt. 3.1.1. beschrieben.

In Fraktion 2 d.h. zwischen 2 und 3 cm zeigte sich ein Peak mit kleinem Nachpeak (Abb. 3.2).

Aufgrund dieser qualitativen Analyse konnte davon ausgegangen

werden, daß die radiochemische Reinheit der Substanzen ausreichend war.

3.2. Dünnschichtchromatogramm von nicht markiertem Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME

Die chemische Reinheit der Substanzen Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME wurde dünnschichtchromatographisch analog Abschnitt 3.1.1. (a) überprüft.

Nach Anfärbung der Peptide mit TDM-Reagens (von Arx, E., Faupel, M., Brugger, M., 1976) waren auf der DC-Platte drei blaugrüne Flecke erkennbar (Abb. 3.3).

Es ergaben sich folgende Rf-Werte:

Met-Enkephalin	0,34
Leu-Enkephalin	0,36
DAMME	0,23

^{3}H-Met-Enkephalin und Met-Enkephalin liegen im gleichen hRf-Bereich von 25-35 (vgl. 3.1.1.).

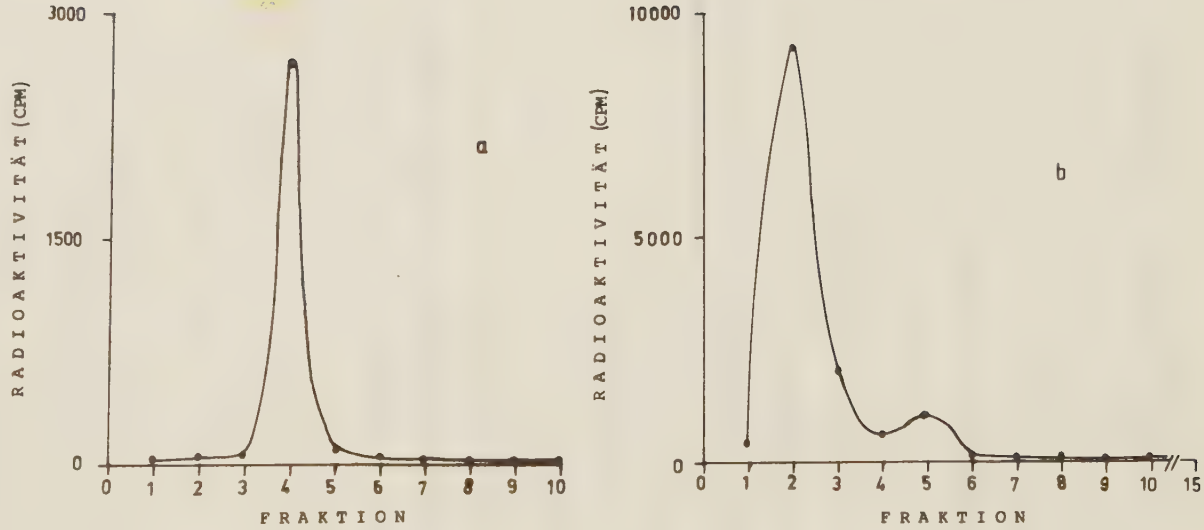

Abb. 3.1: Radioaktivität der einzelnen Fraktionen der Dünnschichtchromatogramme (Tyrosyl-3,5-^{3}H)-Enkephalin(5-L-Methionin).
Laufmittel: a) n-Butanol:Wasser:Methanol (4:3:1) (80 ml) + 2-Mercaptoethanol (0,5 ml)
b) Ethylacetat:Pyridin:Wasser:Eisessig (100:43:25:11) + 20 mg DL-dithiothreitol

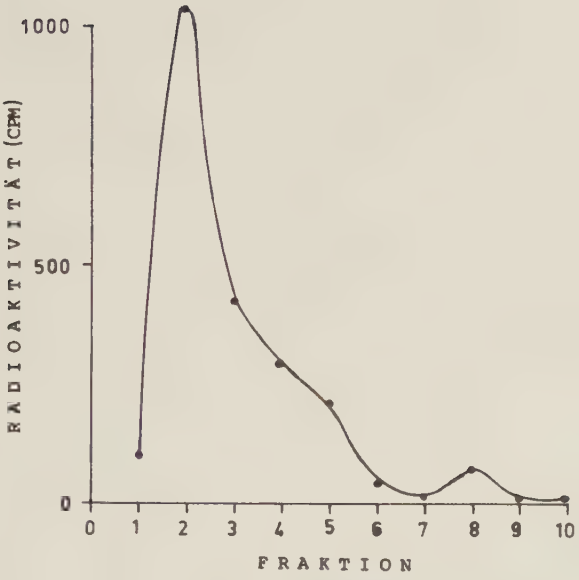

Abb. 3.2: Radioaktivität der einzelnen Fraktionen des Dünnschichtchromatogramms von ^{3}H-Morphin
Laufmittel: Methanol:Ammoniak (100:1,5)

Abb. 3.3: Dünnschichtchromatogramm von Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME:

I = Leu-Enkephalin
II = DAMME
III = Met-Enkephalin

Laufmittel: n-Butanol:Wasser:Methanol (4:3:1) (80ml)
+ 2-Mercaptoethanol (0,5 ml)

3.3. Isolierung der Langerhansschen Inseln

Die Methode zur Gewinnung von Langerhansschen Inseln aus dem Rattenpankreas basiert auf der Methode von Lacy, P.E. und Kostianovsky, M., 1967. Um für die Bindungsstudien eine ausreichende Inselausbeute zu erzielen, wurden die Ratten drei Stunden vor Entnahme des Pankreas mit 60 mg Pilocarpin-HCl pro kg Körpergewicht i.p. vorbehandelt (Kuo, W.N. et al., 1973).

Die Ratten wurden mit je 0,15 ml einer 4-prozentigen Pilocarpin-HCl-Lösung pro 100 g Körpergewicht i.p. vorbehandelt. Nach 3 Stunden wurden sie mit Ether narkotisiert; das Abdomen wurde durch einen Schnitt bis zum Brustbein und durch Querschnitte an beiden Rippenbögen geöffnet. Der Ductus pancreaticus wurde zur Leber hin abgebunden; das Duodenum zum Magen hin abgeklemmt. Dann wurden durch den Ductus pancreaticus 10 ml eisgekühlte Hanks' Lösung in das Pankreas eingespritzt. Das nun gut sichtbare Pankreas wurde mit einer Schere von Magen, Leber, Milz und Darm getrennt, entnommen und in einer Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen. Noch vorhandene Fettpartikel wurden entfernt. Die isolierten Pankreata wurden mit einer Schere klein geschnitten, dann in einem Meßzylinder zweimal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen und von noch verbliebenen, oben aufschwimmenden Fettpartikeln befreit. Die Gewebesuspension wurde mit 650 Einheiten Collagenase pro Gramm Suspension versetzt und bei einer Wasserbadtemperatur von 37 °C im Meßzylinder mit Hilfe eines Magnetrührers zunächst 2 min bei schneller Drehzahl, dann bei langsamer gerührt.

Nach entsprechender Verdauungszeit, die durch Überprüfung des

Verdauungsgrades unter dem Mikroskop bestimmt wurde, wurde die Collagenase-Gewebesuspension eiskalter Hanks' Lösung verdünnt und so die Verdauung gestoppt. Die Suspension wurde dann mehrmals (15-20 mal) durch den Konus einer 10 ml Spritze vorsichtig hin und her gezogen. Die nun sehr feine Suspension wurde durch ein Plastikteesieb in einen mit etwa 10 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Meßzylinder gegeben. Nach kräftigem Durchschütteln wurde die Suspension zum Sedimentieren 5 min stehen gelassen. Die Langerhansschen Inseln setzen sich aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichtes schneller ab als die exokrinen Teilchen, sodaß diese mit dem Überstand abgesaugt werden konnten. Die Flüssigkeit wurde durch neue eiskalte Hanks' Lösung ersetzt. Der Sedimentationsvorgang wurde mehrmals wiederholt; anschließend wurden die Inseln unter dem Stereomikroskop mit einer Mikrosaugpipette aussortiert.

3.4. Vorinkubation

Die Vorinkubation dient der Stoffwechselregenerierung der Inseln nach dem Isolierungsprozeß.

3.4.1. Vorinkubation der Inseln für die Insulinsekretion

Die isolierten Inseln wurden in ein 5 ml-Gläschen gegeben. Nach dem Absetzen der Inseln wurde die Hanks' Lösung abgesaugt und durch 2 ml KRB-Albumin(2%)-Lösung, die 3 mM Glucose enthielt, ersetzt. Das Glas wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über

eine Kanüle mit Carbogen begast und bei 37 °C im Schüttelwasserbad 30 min langsam geschüttelt. Anschließend wurden sie im Eisbad 3 mal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

3.5. Durchführung der Bindungsstudien

3.5.1. Vorgehen

Die für die Untersuchungen zur Bindung verwendeten Inseln wurden nach der Isolierung in ein silikonisiertes Gläschen gegeben und bei ca 100 g zentrifugiert. Die Hanks' Lösung wurde abgesaugt und durch KRB-Albumin(2%)-Puffer ersetzt. Für die Verdrängungsstudien wurden jeweils 50 µl der Inselsuspension in Plastikgläschen zusammen mit 30 µl bzw. 20 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer und der in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Konzentrationen an markierter bzw. unmarkierter Substanz inkubiert. Das Inkubationsendvolumen betrug 100 µl. Die Inkubationszeit lag bei 60 min, die Temperatur bei 20 °C, es sei denn es wurden Untersuchungen zur Zeit- bzw. Temperaturabhängigkeit durchgeführt.

Die Inkubation wurde nach 60 min gestoppt, indem die Gläschen in ein Eisbad übergesetzt wurden und kurz darauf mit 200 µl der eisgekühlten KRB-Albumin(0,2%)-Lösung verdünnt wurden.

Die bereits in KRB-Albumin(0,2%) gewässerten Filterplättchen wurden unmittelbar vor der Filtration auf die Absaugevorrichtung gebracht (Vakuum, Wasserstrahlpumpe) und etwas trocken gesaugt. Über diese Filterplättchen erfolgte dann die Trennung der Inseln vom Inkubationsmedium. Zum Nachwaschen wurden 500 µl der 0,2%igen

KRB-Albumin-Lösung genommen. Die Filterplättchen wurden über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Morgen erfolgte die Messung nach Zugabe von 10 ml Szintillatorflüssigkeit im Szintillationszähler.

3.5.2. Quenchkorrektur in Theorie und Praxis

In der Apparatur wird die gerätetypische Countzahl gemessen (cpm), die nicht identisch mit der absoluten Zahl der radioaktiven Zerfälle (dpm) ist.

Jede Substanz im Zählgläschen erniedrigt die Photonen-Ausbeute. Dieser Effekt wird als "Quenching" oder auch Fluoreszenz-Löschung bezeichnet; die Substanzen als "Quencher" oder "Löschsubstanzen". Durch sie kommt es zu einer Verschiebung des Impulshöhenspektrums eines Isotops in Richtung niedriger Energien. Die Zählausbeute wird verringert und muß korrigiert werden.

Um die absolute Zerfallsrate zu bestimmen, muß der Löscheffekt in jeder Probe ermittelt werden. Dies geschieht anhand von Quenchkurven. Die Korrektur erfolgte bei den Bindungsstudien mit der Methode des externen Standardkanalverhältnisses. Dabei wird nach jeder Messung einer Probe von außen eine gamma-Strahlungsquelle (hier: Barium-Isotop 133) unter die Probe gefahren und das Kanalverhältnis des externen Standards bestimmt. Der dabei ermittelte Wert ESCR ist ein indirektes Maß für den Quencheffekt in der Probe, da er die absolute Radioaktivität mit den verminderten Radioaktivitäten in zwei Kanälen mit unterschiedlicher Diskriminatoreinstellung vergleicht.

Als mögliche Löschsubstanzen kamen bei den Versuchen mit ^{3}H-Met-Enkephalin bzw. ^{3}H-Morphin in Frage:

- KRB-Lösung
- Wasser
- Inseln
- Filterplättchen

Weiterhin hängt die Zählausbeute von der Effektivität des Zählgerätes und von der Reinheit der Szintillatorlösung ab.

Für die Tritium-Eichkurve wurden ^{3}H-Standardproben hergestellt. Jede Probe der Meßreihe enthielt 20 µl einer wässrigen ^{3}H-Met-Enkephalinlösung genau definierter Aktivität. Diese Menge wurde in die Szintillationsgefäße einpipettiert und eine Nacht zum Trocknen stehen gelassen.

Zur Erstellung der Quenchkurve wurden am nächsten Tag die verschiedenen, potentiellen Quenchsubstanzen zugegeben.

1. Es wurden unterschiedliche Volumina an Wasser (0–100 µl) zupipettiert.
2. Zusatz von 0 bis 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer
3. Zusatz von Inseln (0 bis 372) mit je einem Filterplättchen.
4. Zusatz von Filterplättchen (1 bis 3).

(Inseln + Filterplättchen wurden in getrocknetem Zustand in die Szintillationsgefäße gegeben).

Anschließend wurde jede Probe mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit auf Toluolbasis aufgefüllt und im Szintillationszähler gezählt. Die Quenchkorrektur wurde für ^{3}H-Morphin analog durchgeführt.

3.5.3. Auswertung: Berechnung der Zählausbeute und Aktivität

- Zählausbeute

Unter der Zählausbeute versteht man das Verhältnis von gemessener Zählrate zur tatsächlichen Zerfallsrate.

Daraus ergibt sich folgende Gleichung:

Die Zählausbeute bzw. Efficiency

$$\eta = \frac{\text{Zahl der gezählten Ereignisse (cpm)}}{\text{Zahl der Zerfälle (dpm)}}$$

Die eingesetzte Zählrate zur Berechnung der Efficiency ergab sich aus den Mittelwerten der Nullproben d.h. der ungequenchten Proben. Die tatsächliche Aktivität dieser Proben wurde nach den Herstellerangaben zur spezifischen Aktivität der Substanz errechnet. Der ermittelte Quotient x 100 wurde als $\%\eta$ angegeben:

Mittelwert der Nullproben für ^{3}H-Met-Enkephalin	6512 cpm
Aktivität von 20 ul eingesetzter ^{3}H-Met-Enkephalinlösung	9548 dpm
$\%\eta$	68,2%

Die jeweils errechneten $\%\eta$ einer Probe wurden in einem Koordinatensystem dargestellt, wobei die vom Gerät ausgedruckten ESCR-Werte als Abszisse gegen $\%\eta$ als Ordinate aufgetragen wurden. Es besteht keine Abhängigkeit des ESCR von den zugesetzten Quenchparametern (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Quenchkorrektur jeder einzelnen Probe muß deshalb nicht vorgenommen werden, wenn sich der ESCR-Wert im Bereich zwischen 200 und 230 für ^{3}H-Met-Enkephalin bewegt.

- Aktivität

Die Aktivität (dpm) jeder Probe kann nun aus der gemessenen Zählrate und der errechneten % η bestimmt werden:

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{\% \, \eta}$$

3.5.4. Spezifische/unspezifische Bindung

Messung und Berechnung

Zur Berechnung der "spezifischen Bindung", d.h. der eigentlichen Rezeptor-Ligand Bindung, wurde an jedem Tag neben der Gesamtbindung auch die unspezifische Bindung des radioaktiven Liganden gemessen. Als unspezifische Bindung wird diejenige Bindung bezeichnet, die trotz eines 10^5 fachen Überschusses an nicht markiertem Enkephalin bzw. Morphin im Vergleich zum radioaktiv markierten Liganden gebunden wird. Sie ist u.a. abhängig von der Art des Filters (siehe 3.5.5.).

Die spezifische Bindung errechnete sich jeweils aus der Differenz der gemessenen Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung.

3.5.5. Auswahl des Filtermaterials

Die Sensitivität einer Methode ergibt sich aus dem Abstand zwischen Meßsignal und Untergrundaktivität. Eine hohe Empfindlichkeit kann also nur bei niedriger Untergrundaktivität, also z.B. einer geringen Bindung der Opioide an das zur Trennung verwendete Filtermaterial erreicht werden. Es wurden diesbezüglich

Celluloseacetat-Filter (Millipore),

Cellulosenitrat-Filter (Millipore) und

Glasfaser-Filter

miteinander verglichen. Cellulosenitrat-Filter binden ^{3}H-Met-Enkephalin sehr stark; auch die Bindung an Celluloseacetat-Filter war bei verschiedenen Nachwaschungen sehr stark, etwa 1,4 mal stärker ("spezifische" und unspezifische Bindung) als an Glasfaserfilter (Ergebnisse nicht gezeigt). Abgesehen davon war die Filtrationszeit bei Glasfaserfiltern (< 2 Sekunden) am kürzesten, was der Anforderung an eine schnelle Trennung bei einer Ligand-Rezeptorbindung mit möglicherweise sehr schneller Dissoziationsgeschwindigkeit am ehesten entspricht.

3.5.6. Auswahl des Auswaschvolumens

In Versuchen wurde auch die benötigte Menge Auswaschvolumen festgestellt: Volumina zwischen 50 und 200 µl führten zu einer hohen "Bindung" an das Glasfilter, während die Leerwerte bei Verwendung von mehr als 500 µl, nicht mehr wesentlich gesenkt werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.5.7. pH-Einstellung

Der Opiatrezeptor existiert in zwei Formen, von denen die eine eine hohe Affinität für Agonisten hat, während die andere nur Antagonisten binden kann. Die Überführung der Agonist- in die Antagonist-Bindungsform wird durch Na^+-Ionen ausgelöst (vgl. 1.2.5.2.). In mehreren Arbeiten wurde die Abhängigkeit der Rezeptorbindung verschiedener Opioide von der Natriumionenkonzentration untersucht (Pert, C.B. et al., 1977, Simantow, R. et al., 1976). Die Sensitivität, die die Opioide gegenüber diesem Na-Effekt zeigen läßt die Differenzierung der Rezeptorbindung eines Agonisten, Antagonisten und Partialagonisten zu (erwähnt bei Pasternak, G.W. und Snyder, S.H., 1974).

Der Einfluß verschiedener Ionen auf die Rezeptorbindung der Enkephaline wurde von Simantow und Snyder untersucht. Kaliumionen zeigten dabei keine oder eine vernachlässigbare Wirkung auf die Bindungsaffinität (Simantow, R. und Snyder, S.H., 1976).

Um bei den eigenen Versuchen einen zusätzlichen Effekt von Natriumionen auf die Rezeptorbindung der Opioide auszuschalten wurde der pH-Wert der Inkubationslösungen mit KOH-Lösung eingestellt.

3.6. Durchführung der Versuche zur Insulinsekretion

3.6.1. Versuchsbedingungen

Nach der Vorinkubation wurde die KRB-Albumin(2%)-Lösung mit Hanks' Lösung ausgewaschen. Die Inseln wurden a 5 Stück in Probengläschen verteilt und mit 1 ml bzw. 990 µl KRB-Hauptinkuba-

tionslösung versetzt. 10 µl der zu untersuchenden Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen, sodaß sich eine Endkonzentration im Inkubationsmedium von 10^{-11} M bis 10^{-6} M ergab, wurden zugesetzt. Die Hauptinkubation wurde 90 min bei 37 °C unter Carbogenbegasung im Schüttelwasserbad durchgeführt. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Proben sofort gut gemischt (aufgeschüttelt), in Eis gestellt und 100 µl des Überstandes abpipettiert; die entnommenen 100 µl wurden zur späteren Bestimmung des Insulingehalts bei - 20 °C eingefroren. In den Inkubationsgläschen wurde die Inselzahl protokolliert, um später bei der Berechnung auf 5 Inseln normalisieren zu können. Bei den zu untersuchenden Substanzen handelte es sich um Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, DAMME und Morphin. Da für die Opioidpeptide kein selektiver Antagonist zur Verfügung steht, wurde lediglich bei den Versuchen mit Morphin die antagonistische Wirkung von Naloxon bzgl. der durch Morphin erzeugten Effekte auf die Insulinsekretion untersucht.

3.6.2. Bestimmung der Insulinsekretion der Inseln

Die Messung der Insulinkonzentration im Medium erfolgte nach der radioimmunologischen Doppelantikörpermethode von Soeldner, J.S. und Slone, D., 1965 in Doppelbestimmungen. Verwendet wurde der Radioimmunoassay Kit insik-1. Zur Erstellung der Eichkurve diente Ratteninsulin als Standard.

Den zu bestimmenden Proben und den Standardinsulinlösungen wurden jeweils 10 µl entnommen und 1:10 mit einem Puffergemisch folgen-

der Zusammensetzung verdünnt:

Na_2HPO_4 2 H_2O	1,06 g
Na-EDTA	0,372 g
Rinderserumalbumin	0,1 g
Aqua bidest. ad	100 ml

Der lyophilisierte Antikörperkomplex wurde laut Vorschrift gelöst und jeweils 100 µl davon den Proben zugegeben und diese gut geschüttelt. Die Proben wurden für ca. 6 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurden jeweils 100 µl des gelösten ^{125}J-Insulins zugesetzt und die Proben wiederum für 18 Stunden bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt.
Es wurden dann 1 ml kalter Puffer zugesetzt. Nach dem Zentrifugieren von 18 Minuten bei 3500 U/min konnte der Überstand abdekantiert werden. Die Gläschen wurden umgekehrt aufgestellt, um die am oberen Rand hängenden Tröpfchen ablaufen zu lassen. Mit einer Wasserstrahlpumpe konnten noch anhaftende restliche Tröpfchen abgesaugt werden.
Die Proben wurden im automatischen Gamma-Counter 1 Minute lang gezählt.

Berechnung der Insulinwerte:
Aus den Doppelbestimmungen ließ sich der Mittelwert der Zählrate bestimmen. Anhand der mit dem Mikrocomputer Hewlett & Packard 9845 geplotteten Eichkurve wurden die Insulinwerte berechnet.

3.7. Versuche mit Cysteamin

- Orale Vorbehandlung der Ratten mit Cysteamin

Den Versuchstieren (2.1) wurde 18 Stunden vor Versuchsbeginn eine Einzeldosis von Cysteamin-HCl-Lösung (2.3.4.) per Schlundsonde verabreicht. Die Dosierung betrug entsprechend der in der Literatur vorgefundenen Angaben 30 mg/100 g Körpergewicht (Kanatsuka, A. et al., 1984). Die Isolierung der Langerhansschen Inseln wurde entsprechend Pkt. 3.3. durchgeführt.

- Vorinkubation der Inseln cysteaminvorbehandelter Ratten

Die Inseln wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad 60 min lang in Krebs-Ringer-HEPES-Vorinkubationslösung, der Cysteamin in einer Konzentration von 100 mg/l (Petersson, B. und Hellerström, C., 1984) zugesetzt wurde, inkubiert. Nach Beendigung der Vorinkubation wurde diese gründlich mit eiskalter Hanks' Lösung ausgewaschen.

- Vergleich der Insulinsekretion von Inseln cysteaminvorbehandelter Ratten mit Inseln von Ratten, die nicht mit Cysteamin vorbehandelt waren.

Die Inseln von cysteaminvorbehandelten und unbehandelten Ratten wurden nach der Vorinkubation in Gegenwart von 16,7 mM Glucose 90 Minuten lang in Krebs-Ringer-HEPES-Puffer inkubiert und die freigesetzte Insulinmenge bestimmt.

- Durchfürung der Versuche zur Insulinsekretion nach Cysteaminvorbehandlung

Die Sekretionsversuche wurden entsprechend Pkt. 3.6.1. durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte in Gegenwart von 16,7 mM Glucose und 10^{-11} bis 10^{-8} M Met-Enkephalin. Inkubiert wurde in Krebs-Ringer-HEPES-Inkubationsmedium (2.3.3.).

3.8. Statistische Auswertung

Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte $\pm$ SEM. Der t-Test nach Student wurde zur statistischen Prüfung auf Unterschiede zwischen Mittelwerten von Kontroll- und Versuchsgruppen angewandt. P-Werte gleich und kleiner 5% ($p < 0,05$) wurden als signifikant bewertet.

4. E R G E B N I S S E

4.1. ^{3}H-Met-Enkephalinbindung

4.1.1. Temperaturabhängigkeit

Die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung wurden in zwei Versuchen bei 4 °C, 20 °C und 37 °C gemessen. Dabei ergab sich bei einer 60-minütigen Inkubation eine fast zweimal höhere spezifische Bindung bei 20 °C gegenüber 4 °C. Bei 37 °C war die Bindung deutlich geringer als bei 20 °C, ohne jedoch die niedrigen Werte von 4 °C zu erreichen (ohne Abb.).
Für die Bindungsstudien wurde daher eine Inkubationstemperatur von 20 °C gewählt.

4.1.2. Zeitabhängigkeit

Abwesenheit von Bacitracin

Abb. 4.1 zeigt die spezifische Bindung von ^{3}H-Met-Enkephalin in Abhängigkeit von der Zeit. Die Inkubationsdauer betrug zwischen 10 und 120 Minuten. Dem Verlauf der Kurve ist zu entnehmen, daß die Bindung mit der Zeit zunimmt, bei 60 Minuten das Maximum erreicht und dann geringfügig abnimmt. Nach 60 Minuten betrug die von 100 Inseln spezifisch gebundene Menge radioaktives ^{3}H-Met-Enkephalin 2,6 fmol pro 100 Inseln (Abb. 4.1, Tab. 4.1).

Zusatz von Bacitracin

Der Zusatz von Bacitracin (Endkonzentration 50 µg/ml) bei diesen Versuchen ergab ebenfalls ein Optimum der Bindung bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten. Insgesamt wurde bei diesen Versuchen mit Bacitracinzusatz eine geringere Rezeptor-Bindung gemessen (ohne Abb.).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Bindungsstudien eine Inkubationszeit von 60 Minuten ohne Zusatz von Bacitracin gewählt.

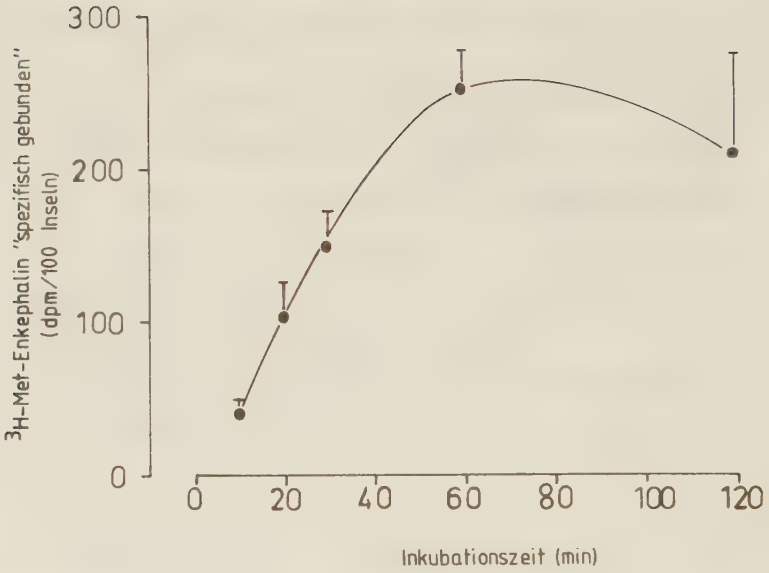

Abb.4.1: Zeitabhängigkeit der "spezifischen Bindung" von ^{3}H-Met-Enkephalin

Ca. 100 Inseln wurden in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer bei 20 °C von 10 bis 120 Minuten in Gegenwart von 10^{-9} M ^{3}H-Met-Enkephalin inkubiert.

Mittelwert ± SEM, n = 2-4

Tab. 4.1: Zeitabhängigkeit der "spezifischen Bindung" von ^{3}H-Met-Enkephalin

Zeit (min)	^{3}H-Met-Enkephalin "spezifisch gebunden" (dpm/100 Inseln) ± SEM			
10	40 ± 10	(4)		A
20	104 ± 21	(2)		B
30	148 ± 23	(4)		C
60	251 ± 24	(3)		D
120	206 ± 65	(2)		E

Inkubation: ca. 100 Langerhanssche Inseln in 100 µl KRB-Albumin (2%)-Puffer, 20 °C, ^{3}H-Met-Enkephalin 10^{-9} M.
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mittelwert ± SEM
t-Test: AD: $p < 0,001$
BD, CD: $p < 0,02$
ED: n.s.

4.1.3. Verdrängung durch unmarkierte Opioid-Analoga

4.1.3.1. durch Met-Enkephalin

In Abb. 4.2 ist die Verdrängung von ^{3}H-Met-Enkephalin durch unmarkiertes Met-Enkephalin dargestellt. Zu einer konstanten Menge an ^{3}H-Met-Enkephalin (Endkonzentration 10^{-9} M) wurde in steigenden Konzentrationen unmarkiertes Met-Enkephalin zugesetzt. Die Ergebnisse sind als % der spezifischen Bindung bei Abwesenheit von unmarkiertem Met-Enkephalin dargestellt (100% = 118 dpm/100 Inseln). Eine Verdrängung des ^{3}H-Met-Enkephalins durch nicht markiertes fand bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M statt. Bei weiterer Erhöhung der Met-Enkephalin-Konzentration auf 10^{-7} M flachte die Kurve ab, d.h. zusätzliches ^{3}H-Met-Enkephalin wird durch diese Konzentration kaum verdrängt.

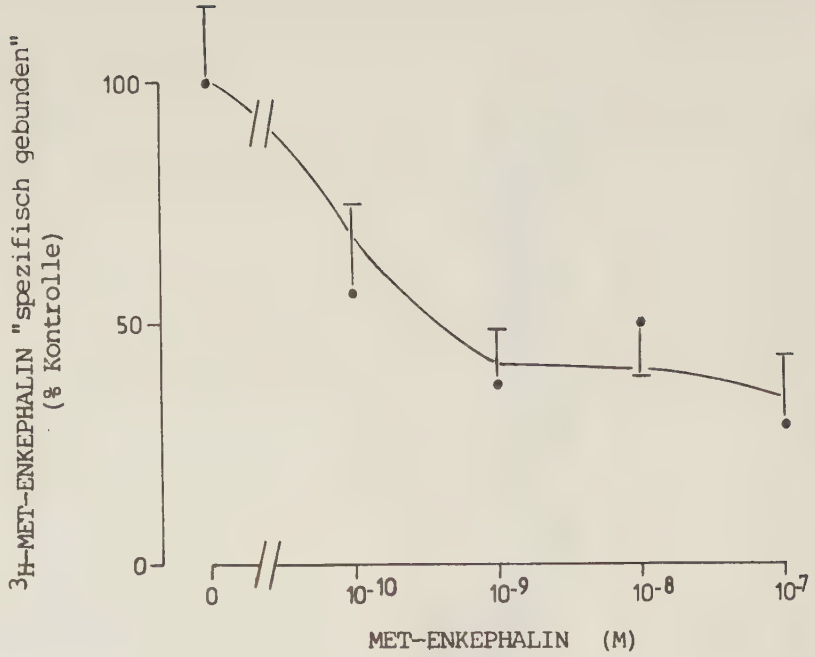

Abb. 4.2: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch unmarkiertes Met-Enkephalin.

Inkubation: ca. 100 Inseln wurden in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C in Gegenwart von 10^{-9} M ^{3}H-Met-Enkephalin und steigenden Konzentrationen unmarkiertem Met-Enkephalin (10^{-10} M, bis 10^{-7} M) inkubiert.
Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10^{-4} M unmarkiertem Met-Enkephalin bestimmt und jeweils von der Gesamtbindung abgezogen.
Mittelwerte ± SEM; n = 4

Tab. 4.2: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch unmarkiertes Met-Enkephalin.

Met-Enkephalin	^{3}H-Met-Enkephalin "spezifisch gebunden"
(M)	(%)
0	100 ± 16
10^{-10}	57 ± 19
10^{-9}	38 ± 11
10^{-8}	50 ± 14
10^{-7}	29 ± 14

Inkubation: ca. 100 Inseln in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C mit ^{3}H-Met-Enkephalin 10^{-9} M und Met-Enkephalin in oben angegebenen Konzentrationen
^{3}H-Met-Enkephalin-Bindung: 100% wenn nicht mit Met-Enkephalin verdrängt wird.
Anzahl der Versuche n = 4
Mittelwert ± SEM

4.1.3.2. durch Leu-Enkephalin

In Abb. 4.3 ist die Verdrängungskurve von ^{3}H-Met-Enkephalin durch unmarkiertes Leu-Enkephalin dargestellt.

Erst bei Konzentrationen von mehr als 10^{-8} M an unmarkiertem Leu-Enkephalin im Inkubationsansatz, läßt sich eine Verdrängung des gebundenen ^{3}H-Met-Enkephalin aus seiner Bindung erkennen. Die Verdrängungskurve besitzt im Konzentrationsbereich von 10^{-7} M bis 10^{-6} M Leu-Enkephalin ein Plateau. Hier kam es zu keiner wesentlichen weiteren Verdrängung des gebundenen ^{3}H-Met-Enkephalins.

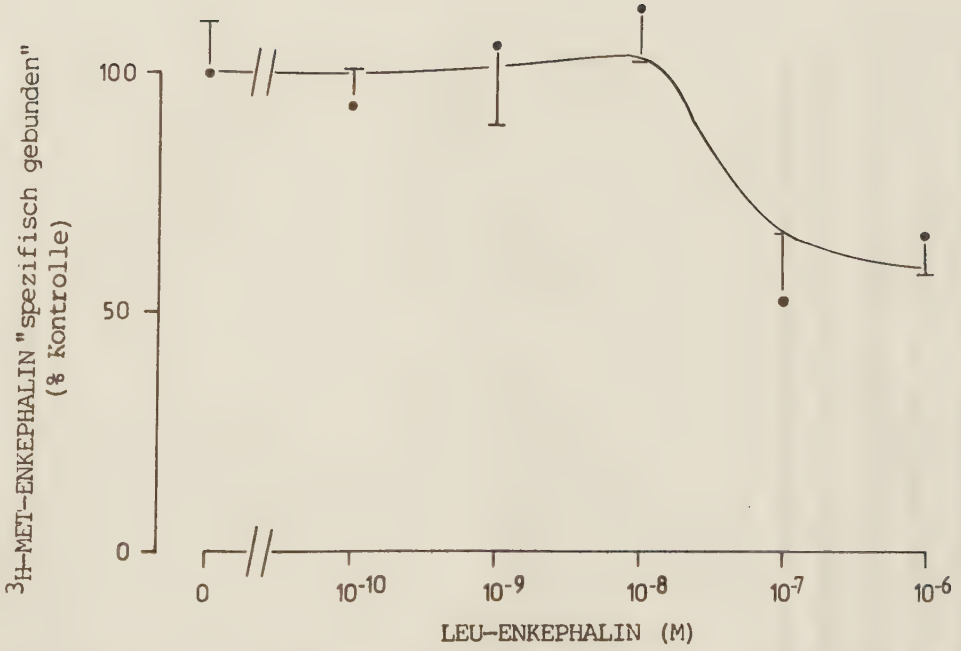

Abb. 4.3: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch Leu-Enkephalin.

Inkubation: ca. 100 Inseln wurden in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C in Gegenwart von 10^{-9} M ^{3}H-Met-Enkephalin und steigenden Konzentrationen an Leu-Enkephalin (10^{-10} M bis 10^{-6} M) inkubiert.
Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10^{-4} M Leu-Enkephalin bestimmt und jeweils von der Gesamtbindung abgezogen.
Mittelwerte ± SEM; n = 5-6

Tab. 4.3: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch Leu-Enkephalin.

Leu-Enkephalin	^{3}H-Met-Enkephalin "spezifisch gebunden"
(M)	(%)
0	100 ± 10
10^{-10}	93 ± 8
10^{-9}	106 ± 16
10^{-8}	115 ± 12
10^{-7}	52 ± 14
10^{-6}	67 ± 9

Inkubation: ca. 100 Inseln in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C mit ^{3}H-Met-Enkephalin 10^{-9} M und Leu-Enkephalin in oben angegebenen Konzentrationen.
^{3}H-Met-Enkephalin-Bindung: 100%, wenn nicht mit Leu-Enkephalin verdrängt wird.
Anzahl der Versuche n = 4-6
Mittelwert ± SEM

4.1.3.3. durch DAMME

In Abb. 4.4 ist die Verdrängungskurve von ^{3}H-Met-Enkephalin durch unmarkiertes DAMME dargestellt. Es kommt zu einer Verdrängung des ^{3}H-Met-Enkephalins durch steigende Konzentrationen an DAMME. Schon bei sehr geringen DAMME-Konzentrationen (10^{-11} M) zeigt sich eine ausgeprägte Verdrängung von ^{3}H-Met-Enkephalin. In Gegenwart von 10^{-10} M DAMME sind noch ca. 40% ^{3}H-Met-Enkephalin spezifisch gebunden. Erhöhung der DAMME-Konzentration auf 10^{-7} M führt zu keiner wesentlichen weiteren Verdrängung.

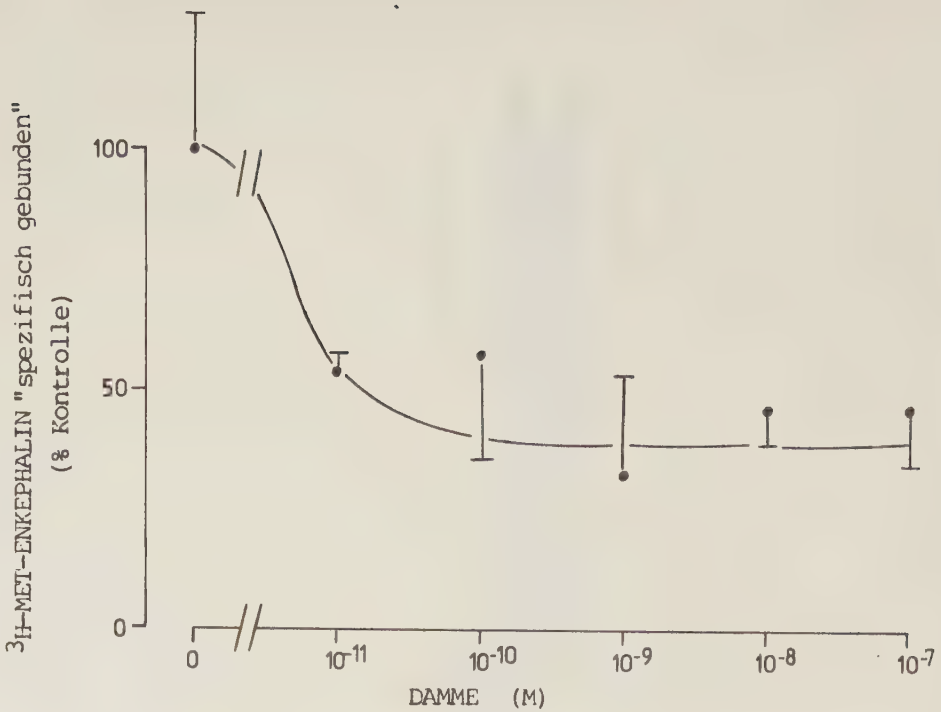

Abb.4.4: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch DAMME.

Inkubation: ca. 100 Inseln wurden in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C in Gegenwart von 10^{-9} M ^{3}H-Met-Enkephalin und steigenden Konzentrationen an DAMME (10^{-11} M bis 10^{-7} M) inkubiert.
Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10^{-4} M DAMME bestimmt und jeweils von der Gesamtbindung abgezogen.
Mittelwert ± SEM; n = 3-7

Tab. 4.2: Verdrängung von "spezifisch gebundenem" ^{3}H-Met-Enkephalin durch DAMME

DAMME	^{3}H-Met-Enkephalin "spezifisch gebunden"
(M)	(%)
0	100 ± 28
10^{-11}	53 ± 4
10^{-10}	58 ± 22
10^{-9}	33 ± 21
10^{-8}	47 ± 8
10^{-7}	47 ± 12

Inkubation: ca. 100 Inseln in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer 60 min bei 20 °C inkubiert mit ^{3}H-Met-Enkephalin 10^{-9} M und DAMME in oben angegebenen Konzentrationen.
^{3}H-Met-Enkephalin-Bindung: 100%, wenn nicht mit DAMME verdrängt wird.
Anzahl der Versuche n = 3-7
Mittelwert ± SEM

4.2. Bindung von ^{3}H-Morphin in Abhängigkeit von der ^{3}H-Morphinkonzentration

Aufgrund der niedrigen spezifischen Aktivität des zur Verfügung stehenden ^{3}H-Morphin konnten keine Verdrängungskurven wie im Falle der Enkephaline (4.1.3.) erstellt werden. Es wurde deswegen an Hand einer sog. Sättigungskurve (Verwendung ansteigender Konzentrationen von ^{3}H-Morphin) überprüft, ob die "spezifische Bindung" von ^{3}H-Morphin sättigbar ist.

Die Abbildung 4.5 zeigt die Abhängigkeit der ^{3}H-Morphinbindung an Langerhansschen Inseln der Ratte von der zugesetzten ^{3}H-Morphin-Konzentration. Bei einer Erhöhung der ^{3}H-Morphin-Konzentration im Inkubationsmedium von 10^{-9} M bis 2,5 x 10^{-7} M nimmt die Bindung kontinuierlich zu. Es findet bei Konzentrationen bis 2,5 x 10^{-7} M ^{3}H-Morphin im Medium keine Sättigung der Bindungsstelle statt. Höhere Konzentrationen konnten aus technischen Gründen nicht eingesetzt werden.

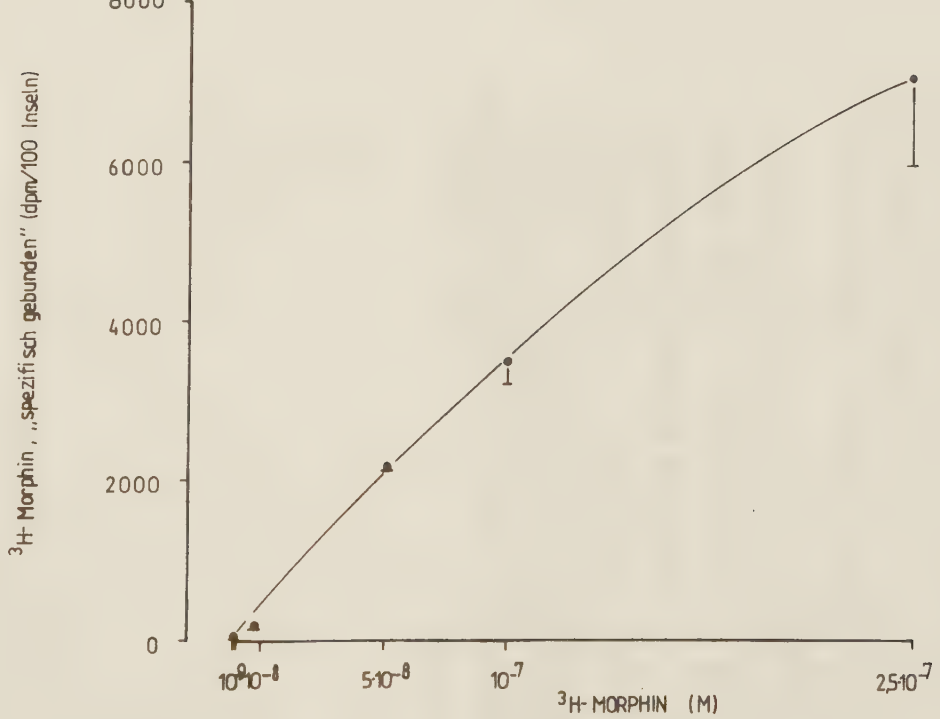

Abb. 4.5: Bindung von ^{3}H-Morphin an Langerhanssche Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der ^{3}H-Morphinkonzentration.

Inkubation: ca. 100 Inseln wurden in 100 µl Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (2% Albumin) 60 Minuten bei 20 °C in Gegenwart von 10^{-9} M bis 2,5 x 10^{-7} M ^{3}H-Morphin inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde bei jeder ^{3}H-Morphinkonzentration durch Zugabe von 10^{-4} M unmarkiertem Morphin bestimmt und von der Gesamtbindung abgezogen.
Mittelwert ± SEM; n = 2-3

Tab. 4.5: Bindung von ^{3}H-Morphin an Langerhanssche Inseln der Ratte in Abhängigkeit von der ^{3}H-Morphinkonzentration.

^{3}H-Morphin	^{3}H-Morphin "spezifisch gebunden"			
(M)	(dpm/100 Inseln) ± SEM			
10^{-9}	52	±	40	(3)
10^{-8}	197	±	8	(2)
5×10^{-8}	2196	±	5	(2)
10^{-7}	3480	±	257	(3)
$2{,}5 \times 10^{-7}$	7033	±	1107	(3)

Inkubation: ca. 100 Inseln in 100 µl KRB-Albumin(2%)-Puffer bei 20 °C inkubiert mit ^{3}H-Morphin in oben angegebenen Konzentrationen.
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mittelwert ± SEM

4.3. Insulinsekretion

Gemessen wurde der Einfluß der Opioide Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und DAMME auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 16,7 mM und 5,0 mM Glucose.

4.3.1. Einfluß von Met-Enkephalin

Abbildung 4.6 zeigt den Einfluß steigender Konzentrationen (10^{-11} bis 10^{-6} M) Met-Enkephalin auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 16,7 mM bzw. 5,0 mM Glucose.

Die Insulinfreisetzung bei 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Met-Enkephalin wurde als Bezugsgröße (100 %) gewählt. Sie betrug 73 ± 7 µU/ml. Durch 16,7 mM Glucose werden 349 ± 17 µU Insulin/ml freigesetzt, was 476 ± 24 % gegenüber dem Bezugswert entspricht.

In Gegenwart einer Glucosekonzentration von 16,7 mM hat Met-Enkephalin einen dualen Effekt: bis zu einer Konzentration von 10^{-9} M kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Insulinsekretion, mit einem maximalen Effekt bei 10^{-10} M Met-Enkephalin. Bei höheren Konzentrationen (10^{-8} M bis 10^{-6} M) fällt die Insulinsekretion bis auf Werte unterhalb des Kontrollwerts ab.

Die basale (5,0 mM) Insulinsekretion wird durch Met-Enkephalin nur gering beeinflußt (10^{-11} M).

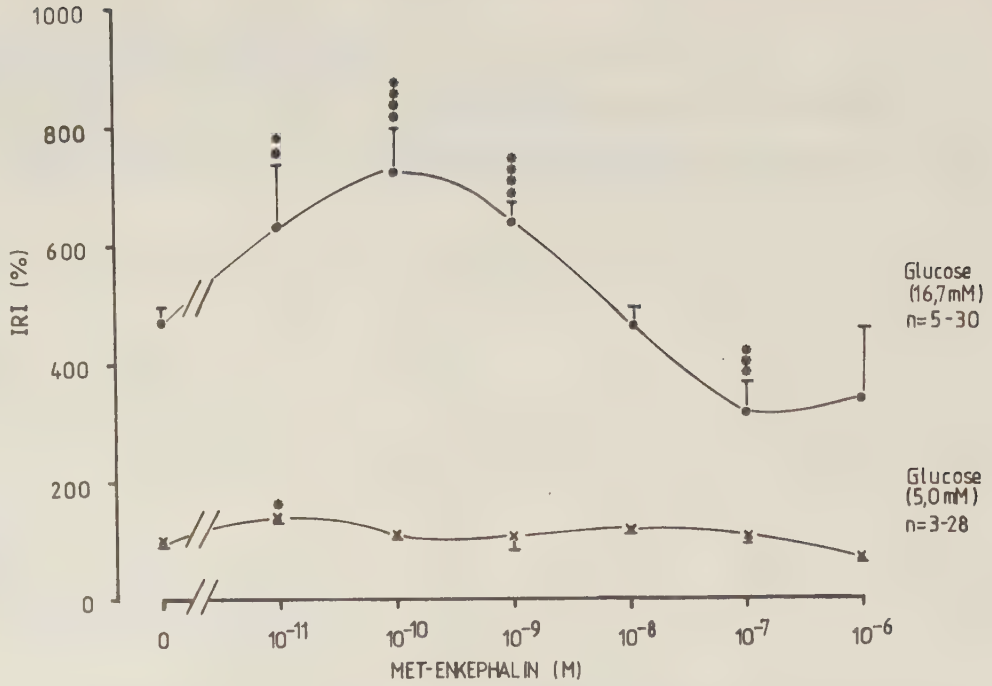

Abb. 4.6: Einfluß von verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-11} M – 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (1,5% Albumin) + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + Met-Enkephalin (10^{-11} M – 10^{-6} M);
Inkubationszeit: 90 min
Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Met-Enkephalin
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche
●p < 0,05, ●●p < 0.02, ●●●p < 0,01, ●●●●p < 0,001

Tab. 4.6: Einfluß von verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-11} M - 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

	Met-Enkephalin (M)						
	0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Glucose	476 ± 24	633 ± 107	727 ± 73	644 ± 31	468 ± 36	319 ± 52	341 ± 124
16,7 mM	(30)	(7)	(5)	(9)	(5)	(7)	(6)
	A	B	C	D	E	F	G
Glucose	100 ± 9	143 ± 6	117 ± 11	112 ± 28	123 ± 4	111 ± 18	75 ± 12
5,0 mM	(28)	(3)	(8)	(14)	(5)	(4)	(4)
	a	b	c	d	e	f	g

Je 5 Inseln wurden 90 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 1,5% Albumin + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + Met-Enkephalin bei 37 °C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert.

Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Met-Enkephalin.
Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche (n) in Klammern
t-Test: AB: $p < 0,02$; AC, AD: $p < 0,001$; AF $p < 0,01$; AE, AG: n.s.
ab: $p < 0,05$; ac, ad, ae, af, ag: n.s.

4.3.2. Einfluß von Leu-Enkephalin

Abbildung 4.7 zeigt den Einfluß von Leu-Enkephalin (10^{-9} M bis 10^{-6} M) auf die Insulinfreisetzung isolierter Langerhansscher Inseln in Gegenwart von 16,7 mM und 5,0 mM Glucose.

Leu-Enkephalin hat einen dualen Effekt: in Gegenwart von 16,7 mM Glucose wird die Insulinsekretion durch Leu-Enkephalin im Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-7} M erhöht, wobei das Maximum bei 10^{-8} M Leu-Enkephalin erreicht wird. Wird die Konzentration an Leu-Enkephalin über 10^{-7} M erhöht, zeigt sich ein hemmender Effekt auf die Insulinfreisetzung.

Die Insulinfreisetzung durch 16,7 mM Glucose in Abwesenheit von Leu-Enkephalin betrug 460 ± 19 % entsprechend 516 ± 21 µU/ml.

Bei basaler Insulinsekretion (5,0 mM Glucose) läßt sich eine geringe Steigerung der Insulinfreisetzung durch Leu-Enkephalin im Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-7} M erkennen.

Die Insulinfreisetzung bei 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Leu-Enkephalin betrug 112 (100%) ± 8 µU/ml.

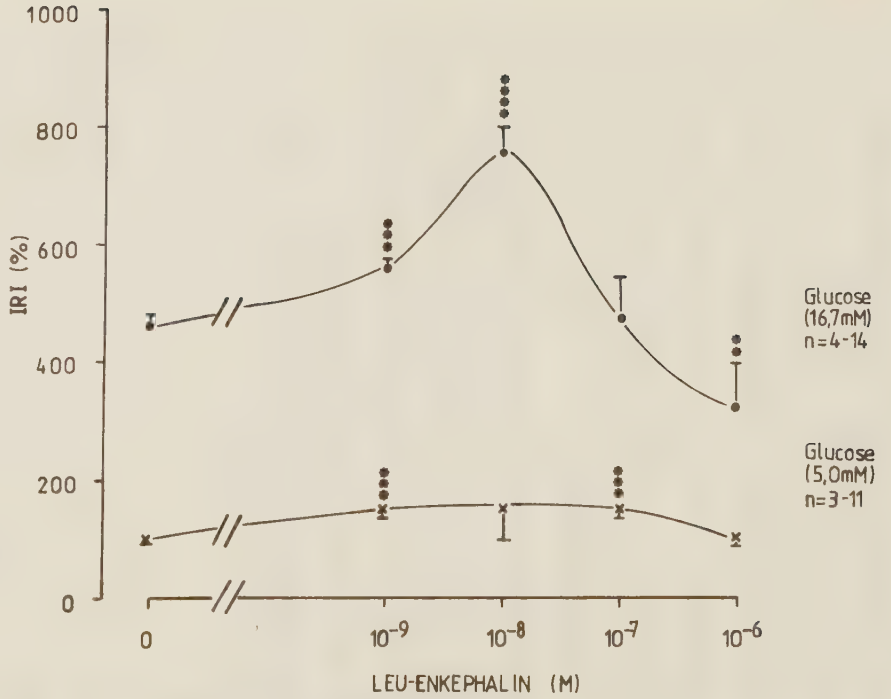

Abb. 4.7: Einfluß von verschiedenen Leu-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-9} M bis 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (1,5% Albumin) + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + Leu-Enkephalin (10^{-9} M - 10^{-6} M);
Inkubationszeit: 90 min
Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Leu-Enkephalin
Mittelwert + SEM; n = Anzahl der Versuche
**p < 0,02, ***p < 0,01, ****p < 0,001

Tab. 4.7: Einfluß von verschiedenen Leu-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-9} M - 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

	Leu-Enkephalin (M)				
	0	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Glucose	460 ± 19	555 ± 19	757 ± 46	476 ± 73	322 ± 78
16,7 mM	(14)	(9)	(8)	(6)	(4)
	A	B	C	D	E
Glucose	100 ± 8	152 ± 10	152 ± 38	154 ± 14	100 ± 11
5,0 mM	(11)	(4)	(6)	(3)	(5)
	a	b	c	d	e

Je 5 Inseln wurden 90 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 1,5% Albumin + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + Leu-Enkephalin bei 37 °C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert.

Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Leu-Enkephalin.
Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche (n) in Klammern

t-Test: AB: $p < 0.01$; AC: $p < 0,001$; AD: n.s.; AE $p < 0,02$
ab: $p < 0.01$; ac, ae: n.s. ad: $p < 0,01$

4.3.3. Einfluß von DAMME

Abbildung 4.8 zeigt den Einfluß von DAMME auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 16,7 mM und 5,0 mM Glucose.

Die durch 16,7 mM Glucose stimulierte Insulinfreisetzung wird in Gegenwart von 10^{-9} M bis 10^{-7} M DAMME geringfügig verstärkt ($p < 0,05$) und fällt wieder ab, wenn die DAMME-Konzentration über 10^{-7} M erhöht wird. Im Vergleich zu Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin erhöht DAMME (über einen Konzentrationsbereich von 10^{-9} M - 10^{-7} M) die Insulinsekretion nur schwach.

In Abwesenheit von DAMME und 16,7 mM Glucose betrug die freigesetzte Insulinmenge 338 ± 23 µU/ml (= 617 ± 42 %)

Die basale Insulinsekretion wird in Gegenwart von DAMME im Konzentrationsbereich von 10^{-9} M - 10^{-8} M stimuliert.

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als % der Kontrolle bei 5,0 mM Glucose. Dieser Wert entspricht 55 ± 4 µU/ml Insulin (=100 %).

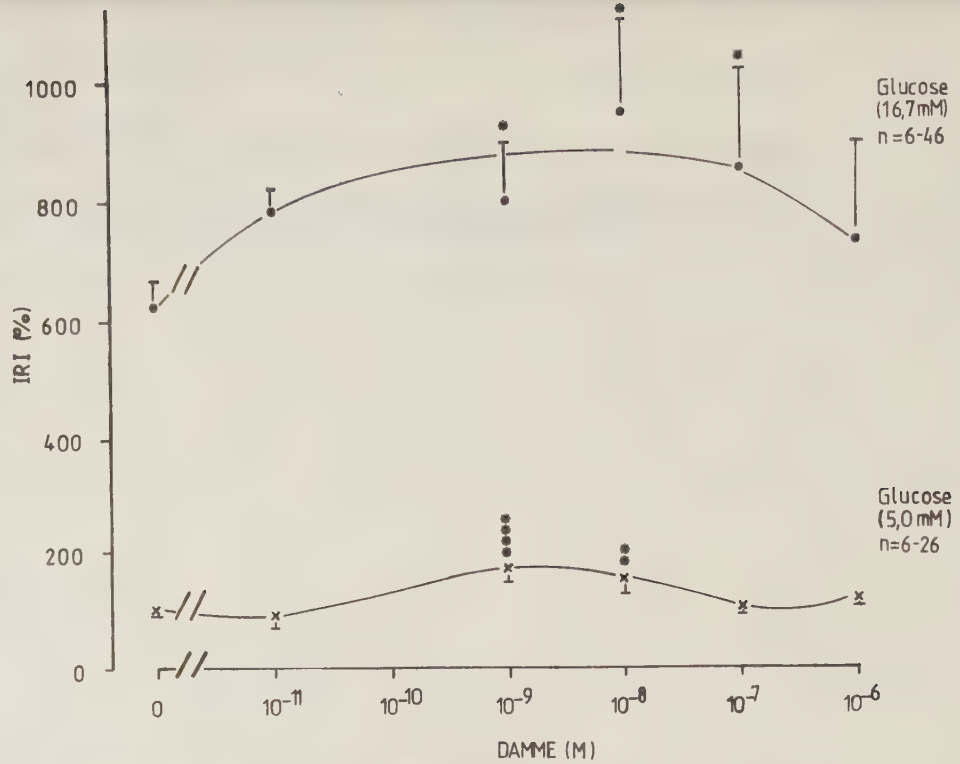

Abb. 4.8: Einfluß von verschiedenen DAMME-Konzentrationen (10^{-11} M - 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer (1,5% Albumin) + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + DAMME (10^{-11} M - 10^{-6} M).
Inkubationszeit: 90 min
Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von DAMME
Mittelwert ± SEM; n = Anzahl der Versuche
*p < 0,05, **p < 0,02, ****p < 0,001

Tab. 4.8: Einfluß von verschiedenen DAMME-Konzentrationen (10^{-11} M - 10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

	DAMME (M)					
	0	10^{-11}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Glucose	617 ± 42	776 ± 37	792 ± 101	940 ± 159	851 ± 166	730 ± 161
16,7 mM	(46)	(6)	(14)	(7)	(8)	(11)
	A	B	C	D	E	F
Glucose	100 ± 7	92 ± 18	172 ± 22	155 ± 29	102 ± 13	115 ± 12
5,0 mM	(26)	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
	a	b	c	d	e	f

Je 5 Inseln wurden 90 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 1,5% Albumin + Glucose (5,0 mM, 16,7 mM) + DAMME bei 37 °C im Wasserbad unter Carbogenbegasung inkubiert.

Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von DAMME
Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche (n) in Klammern

t-Test: AC, AD, AE: $p < 0,05$
ac: $p < 0,001$; ad: $p < 0,02$

4.3.4. Einfluß von Morphin

Gemessen wurde der Einfluß von Morphin auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion bei 16,7 mM und 5,0 mM Glucose und von Morphin + Naloxon (10^{-6} M) in Gegenwart von 16,7 mM Glucose.

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4.9 zeigen:

(a) die Insulinsekretion nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Morphin (10^{-11} M bis 10^{-6} M) in Abwesenheit von Naloxon und mit Zusatz von Naloxon (10^{-6} M) bei stimulatorischer Glucosekonzentration (16,7 mM).

(b) die Insulinfreisetzung bei 5,0 mM Glucose und verschiedenen Morphinkonzentrationen (10^{-9} M - 10^{-6} M).

Weder Morphin noch Morphin + Naloxon führen bei einer der hier verwendeten Konzentrationen zu einer signifikanten Veränderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Auch bei 5,0 mM Glucose kommt es unter Einfluß von Morphin zu keiner signifikanten Abweichung von der Basalsekretion.

Insulinfreisetzung ohne Zusatz von Morphin:

16,7 mM Glucose:	477 ± 31 µU/ml
16,7 mM Glucose + Naloxon (10^{-6} M):	415 ± 39 µU/ml
5,0 mM Glucose:	180 ± 27 µU/ ml.

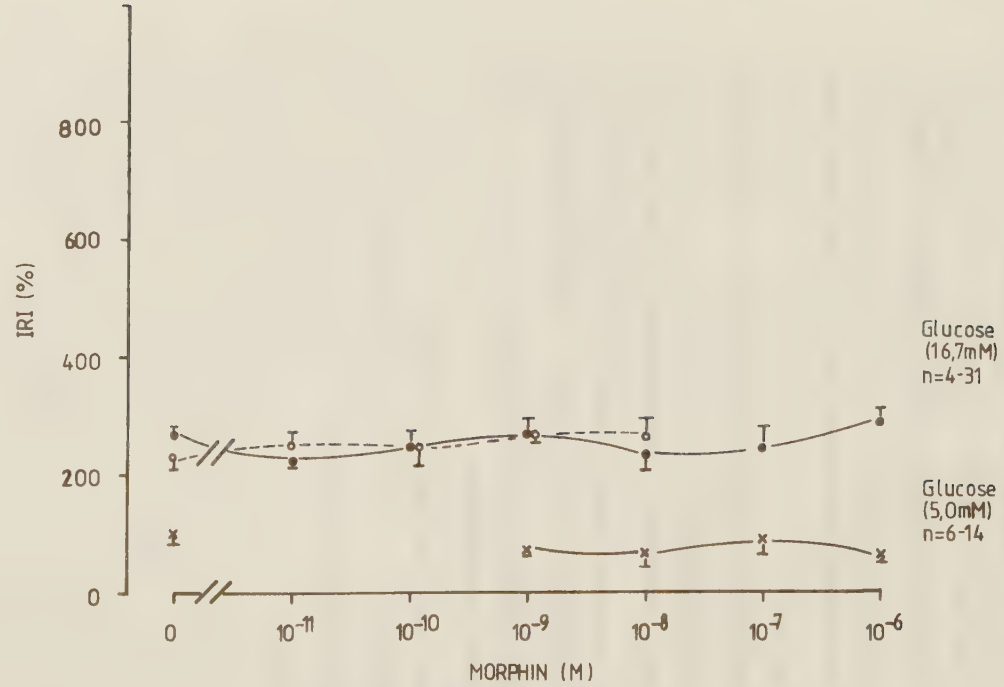

Abb. 4.9: Einfluß von verschiedenen Morphinkonzentrationen -●---●- und Morphin (10^{-11} M - 10^{-8} M) + Naloxon (10^{-6}) M -o--o- auf die Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

Inkubation: je 5 Inseln wurden in 1 ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit 1,5% Albumin + Glucose 5,0 mM, 16,7 mM) + Morphin -●--X- in oben angegebenen Konzentrationen und Morphin + Naloxon (10^{-6} M) -o--o-.

Inkubationszeit: 90 min

Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Morphin

Mittelwert ± SEM; n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.9: Einfluß von verschiedenen Morphinkonzentrationen und Morphin + Naloxon (10^{-6} M) auf die Insulinsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,0 mM und 16,7 mM Glucose.

	Morphin (M)						
	0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Glucose	265 ± 17	225 ± 15	250 ± 24	277 ± 22	232 ± 25	244 ± 39	289 ± 23
16,7 mM	(31)	(21)	(11)	(19)	(13)	(8)	(7)
	A	B	C	D	E	F	G
Glucose 16,7 mM	230 ± 22 (12)	253 ± 18 (6)	249 ± 35 (5)	277 ± 21 (6)	264 ± 32 (4)		
Naloxon (10^{-6} M)	H	I	J	K	L		
Glucose	100 ± 15			74 ± 7	68 ± 25	93 ± 27	67 ± 14
5,0 mM	(14)			(7)	(7)	(8)	(6)
	a			b	c	d	e

Je 5 Inseln wurden 90 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit 1,5% Albumin + Glucose (16,7 mM, 5,0 mM) bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
Insulinsekretion: = 100% in Gegenwart von 5,0 mM Glucose ohne Zusatz von Morphin.
Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche (n) in Klammern
t-Test: AB, AC, AD, AE, AF, AG: n.s.; ab, ac, ad, ae: n.s.

4.4. Cysteaminversuche

4.4.1. Wirkung (Theorie)

Um die Frage zu klären, ob die Enkephaline Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin an isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte die Insulinsekretion über eine Hemmung der Somatostatinsekretion steigern, muß eine Beeinflussung der Insulinausschüttung durch endogen sezerniertes Somatostatin ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit, die Freisetzung von intrazellulärem Somatostatin zu unterbinden, besteht in der Vorbehandlung der Versuchstiere (s.c. oder oral) bzw. der Langerhansschen Inseln während der Vorinkubation mit Cysteamin. Daß es sich beim Cysteamin um eine Substanz handelt, die selektiv somatostatinhaltiges Gewebe entleert, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Kanatsuka, A. et al., 1984; Szabo, S. und Reichlin, S., 1981; Sorenson, R.L. et al., 1983; Petersson, B. und Hellerström, C., 1984; Fujita, Y. et al., 1984).

Der Insulin- und Glukagongehalt der Inselzellen bleibt nach einmaliger Verabreichung von Cysteamin unverändert (Kanatsuka, A. et al., 1984; Patel, Y.C. und Pierzchala, J., 1983; Sorenson, R. L. et al., 1983; Petersson, B. und Hellerström, C., 1984; Fujita, Y. et al., 1984; Ahren, B. et al., 1984). Die Cysteaminvorbehandlung von Ratten stellt ein Modell dar, das die Untersuchung der Inselhormonfreisetzung in Abwesenheit von Somatostatin ermöglicht.

Ein Vergleich von Insulinsekretionskurven unter Ausschluß von Somatostatin nach Cysteaminvorbehandlung könnte Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin

bzgl. der Insulinsekretion zulassen.

4.4.2. Einfluß der Cysteaminvorbehandlung auf die glucose-induzierte Insulinsekretion.

Wie Tab. 4.10 zeigt, war der Einfluß der Cysteaminvorbehandlung im Vergleich zur versuchstierabhängigen Streuung der Insulinsekretion gering. Eine eindeutige Erhöhung der Insulinfreisetzung durch die Cysteaminvorbehandlung konnte nicht nachgewiesen werden. Insbesondere bei Versuchen, die einen deutlichen Effekt durch Cysteamin ergaben wurde beobachtet, daß die Inseln, im Gegensatz zu denjenigen der Kontrolltiere, von guter Qualität und Größe waren.

Tab. 4.10:

	I	II	III	IV
cysteamin-vorbehandelt	415	274	356	378
Kontrolle	265	247	343	245

Mittelwerte aus 4 Einzelversuchen angegeben in:

µE IRI/ml/5 Inseln/90 min

Es wurden daher bei den folgenden Versuchen, die den Einfluß von Met-Enkephalin auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion zeigen, jeweils alle Werte, die bei verschiedenen Met-Enkephalinkonzentrationen ermittelt wurden, auf den Kontrollwert ohne Zugabe von Met-Enkephalin bezogen.

4.4.3. Einfluß von verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-11} M - 10^{-8} M) auf die Insulinsekretion

Es wurde die Insulinsekretion von Inseln cysteaminvorbehandelter bzw. nicht cysteaminvorbehandelter Ratten in Gegenwart von 16,7 mM Glucose und Met-Enkephalin (10^{-11} M -10^{-8} M) gemessen.
Der Tab. 4.11 ist zu entnehmen, daß die Cysteaminvorbehandlung den durch Met-Enkephalin verursachten Anstieg der Insulinsekretion nicht verhindert.
Diesen Ergebnissen zufolge wird die durch Met-Enkephalin modulierte Insulinsekretion nicht über eine Hemmung der Somatostatinfreisetzung erzeugt.

Tab. 4.11: Einfluß von verschiedenen Met-Enkephalin-Konzentrationen (10^{-11} M - 10^{-8} M) auf die durch Glucose (16,7 mM) induzierte Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte. Die Ratten waren mit Cysteamin (I) bzw. nicht mit Cysteamin (II) vorbehandelt.

	Met-Enkephalin (M)				
	0	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}
I	100 ± 4	150 ± 19	186 ± 22	140 ± 7	100 ± 7
	(19)	(5)	(6)	(11)	(8)
II	100 ± 4	101 ± 9	131 ± 21	106 ± 7	101 ± 8
	(12)	(4)	(5)	(8)	(6)

Je 5 Inseln wurden 90 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-HEPES-Puffer mit 1,5% Albumin und Glucose (16,7 mM) inkubiert. Gemessen wurde die während dieser Zeit freigesetzte Insulinmenge.

Insulinsekretion: = 100% in Gegnwart von 16,7 mM Glucose ohne Zusatz von Met-Enkephalin.
Mittelwerte ± SEM; Anzahl der Versuche (n) in Klammern

5. D I S K U S S I O N

5.1. Opioidrezeptor-Bindungen und ihre Zuordnung zu bestimmten Rezeptortypen in der Literatur

5.1.1. Klassifizierung von zwei Opioidrezeptoren: einem Morphin- und einem Enkephalinrezeptor

Opiatrezeptoren umfassen mehrere, in ihrer Affinität zu Opioiden sich unterscheidende Bindungsstellen. Der Beweis für die Heterogenität dieser Rezeptorklasse beruht auf pharmakologischen Untersuchungen an isolierten Organpräparaten (Lord, J.A.H. et al., 1977), auf Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Opiaten und Peptiden (Lord, J.A.H., et al., 1977; Simantov, R. et al., 1978; Chang, K.-J. und Cuatrecasas, P.,1979; Leslie, F.M. et al., 1980) und auf Untersuchungen, bei denen ein Rezeptortyp zunächst selektiv mit einem spezifischen Opioid besetzt wird, dadurch vor der chemischen Inaktivierung durch alkylierende Substanzen wie Phenoxybenzamin und N-Ethylmaleinimid geschützt ist, um anschließend mit radioaktiv markiertem Liganden reagieren zu können. (Robson, L.E. und Kosterlitz, H.W., 1979; Smith, J.R. und Simon, E.J., 1980). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten die Existenz von zwei Rezeptorklassen, einer Morphin-(μ) und einer Enkephalin- (δ) Bindungsstelle. Pharmakologische Wirkungen und unterschiedliche Bindungseigenschaften neu entdeckter und synthetisierter Opioidpeptide und verschiedener Morphinderivate (Benzomorphane) führten später zur Postulierung weiterer Opiatrezeptorklassen.

5.1.2. Biochemische Charakterisierung weiterer Opioidrezeptorklassen

1981 charakterisierten Kosterlitz, H.W. et al. einen Opioidrezeptor (k) für bestimmte Benzomorphane (Bsp. Ethylketazocin), dem als endogene Partner die verschiedenen Dynorphine zugeordnet wurden (Chavkin, C. et al., 1982; Corbett, A.D. et al., 1982). Diese k-Agonisten zeigen einen hohen Grad an Kreuzreaktivität mit dem μ- und in geringem Maße auch mit dem δ-Rezeptor. Einem anderen Benzomorphan (SKF-10047), wurde eine vierte Rezeptorklasse, die σ-Rezeptoren zugeordnet (Pasternak, G.W. et al., 1981). Schließlich deuteten weitere Bindungsstudien mit radioaktivmarkiertem ß-Endorphin auf einen ß-Endorphin- bzw. ε-Rezeptor hin (Li, C.H. et al., 1980; Nicolas, P. et al., 1982).

Die Eigenschaften der verschiedenen Rezeptortypen können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Die μ-Bindungsstelle wird selektiv von Morphin besetzt, das eine nur geringe Bindung an δ und k-Rezeptoren aufweist. Dagegen können ß-Endorphin (ε), Ketazocin und andere k-Liganden in Wechselwirkung mit dem μ-Rezeptor treten. Ebenso kann die δ-Bindungsstelle nicht nur mit δ-Liganden, sondern auch mit ß-Endorphin und in geringerem Maße mit Etorphin, Ketazocin und den endogenen k-Liganden (Dynorphine) besetzt werden.

Eine weitere Differenzierung der Opioidrezeptoren folgte mit der Charakterisierung von Rezeptorsubtypen. Der Vergleich von Bindungsdaten verschiedener Arbeitsgruppen ist kaum möglich, da die heterogene Rezeptorzusammensetzung in Abhängigkeit von der Spezies, dem Organ und der jeweiligen Präparation (5.1.4.) und der Mangel ausreichend selektiver Liganden zu unterschiedlichen

Zuordnungen bestimmter Bindungseigenschaften zu bisher postulierten Rezeptortypen führten (Tab. 5.1).

Die folgenden Ausführungen zeigen, daß es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine einheitliche, allgemein akzeptierte Nomenklatur der Rezeptoren gibt. Dies soll anhand der bisher erschienenen Arbeiten über die Charakterisierung von Opioidrezeptoren aufgezeigt werden.

5.1.3. Nomenklatur der Opioidrezeptoren

Chang, K.-J. und Cuatrecasas, P. unterschieden nach Vergleich der Bindungsaffinitäten verschiedener Opioide zwischen einer hoch- und einer niederaffinen Bindungsstelle und bezeichneten sie entsprechend der vorangegangenen Terminologie als μ- und δ-Rezeptoren (Chang, K.-J. und Cuatrecasas, P., 1979), ebenso Waterfield, A.A. et al., 1979, die für Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin eine hochaffine und eine niederaffine Bindungsstelle identifizierten und mit den zuvor definierten μ- bzw. δ- Rezeptoren verglichen. Pasternak und Kollegen konnten mit Hilfe des an hochaffine Bindungsstellen irreversibel bindenden Antagonisten Naloxazon zeigen, daß diese hochaffine Bindungsstelle, die dem "μ"-Rezeptor entspricht, δ-, μ-, k- und σ-Agonisten mit gleicher Stärke bindet ($K_D < 1$ nM) und vermutlich für die analgetische Wirkung von Opioiden verantwortlich ist. Die niederaffine Bindungsstelle entspricht dem "δ"-Rezeptor, zu dem wiederum Opioidpeptide und Morphinderivate unterschiedliche Affinitäten besitzen (Zhang, A.N.Z. und Pasternak, G.W., 1980; 1981;

Ligand	K_D-Werte hochaffin	K_D-Werte niederaffin	Organpräparation/ Spezies	Autor/Jahr
^{3}H-Leu-Enk.	0,5 nM (δ)	5 nM (u)	Meerschw.-Gehirn	Lord et al., 1977
^{3}H-Met-Enk.	0,7 nM (δ)	3,4 nM (u)	Meerschw.-Gehirn	Waterfield et al.,1979
^{3}H-Leu-Enk.	1,1 nM (δ)	5,3 nM (u)		
^{3}H-Met-Enk.	1,8 nM (δ)	5,8 nM (u)	Gehirnmembran Ratte	Simantov et al., 1978
Morphin/ Naloxon	30 nM (δ)	0,4 nM (u)	Gehirnmembran Ratte	Chang und Cuatrecasas, 1979
Enkephaline	2 nM (δ)	10 nM (u)		
^{3}H-DADLE	0,9 nM (δ)	7,7 nM (u)	Corpus striatum Rind	Leslie et al. 1980
^{3}H-DADLE	2,5 nM	13,1 nM	Nebennierenmark Rind	
^{3}H-DADLE	0,8 nM	9 nM	Samenstrang (Maus)	
^{3}H-DHM	170 nM	1,2 nM	Samenstrang (Maus)	
^{3}H-DADLE	0,6 nM	> 6 nM	Meerschw.-Ileum	
^{3}H-DHM	17 nM 3,2 nM 3,8 nM	0,6 nM	Meerschw.-Ileum Ileum Ratte Ileum Kaninchen	
^{3}H-Ethyl-ketazocin	0,6 nM (k)	3,2 nM (k)	Meerschw.-Gehirn	Kosterlitz et al., 1981
^{3}H-D-Ala^2-Met-Enk.-amid ^{3}H-DHM	0,8 nM (u)	—(δ)— 3–4 nM 18–20 nM	Gehirn Ratte	Zhang und Pasternak, 1980
^{3}H-D-Ala^2-Met-Enk.-amid	0,7 nM	8 nM	Rückenmark Ratte	Zhang und Pasternak, 1981
^{3}H-DHM ^{3}H-D-Ala$_2$-D-Leu-Enk.	< 1 nM (u_1)	3 nM (u_2) 5 nM (δ)	Gehirnmembran Ratte	Wolozin und Pasternak, 1981
^{3}H-Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr	2 nM	20 nM	Gehirn Ratte	David et al., 1982
^{3}H-DHM ^{3}H-DADLE ^{3}H-Etorphin	< 1 nM	δ_1, δ_2, u, k,	Gehirnmembran Ratte	Barnard und Demoliou-Mason, 1983
^{3}H-DADLE	0,2 nM	15 nM	Magenschleimhaut Meerschw.	Kromer et al., 1983

Tab. 5.1: Rezeptorzuordnung und K_D-Werte verschiedener Opioide in unterschiedlichen Organpräparationen und Spezies'.

Pasternak, G.W. et al., 1980). Die schon früher beschriebene hochaffine Bindungsstelle wurde nach weiteren Untersuchungen von Wolozin, B.L. und Pasternak, G.W., 1981 mit μ_1 bezeichnet, die von ihnen gefundenen niederaffinen Bindungsstellen mit μ_2 und δ. Von diesen bindet μ_2 Morphinderivate besser als Opioidpeptide. Die zweite niederaffine Bindungsstelle bindet Opioidpetide besser als Morphinderivate und entspricht dem früheren δ-Rezeptor. Die Arbeitsgruppe um Barnard, E.A. identifizierte 5 Opiodbindungsstellen, eine hochaffine mit $K_D < 1$ nM und vier weitere, die sie δ_1, δ_2, μ und k nannten. Der Enkephalinrezeptor setzt sich nach ihren Befunden aus zwei verschieden affinen Bindungsstellen, δ_1 und δ_2 zusammen, wobei δ_2 dem früher mit σ bezeichneten Opioidrezeptor entspricht (Barnard, E.A. und Demoliou-Mason, C., 1983).

5.1.4. Spezies- und Organunterschiede

Ein weiteres Problem für die genaue Rezeptorzuordnung stellt die unterschiedliche Zusammensetzung der Rezeptorpopulationen in den verschiedenen Organen und Spezies' dar. So konnten im Meerschweinchen-Gehirn 25% der Bindungsstellen den sog. μ-Rezeptoren, 45% den δ-Rezeptoren und 30% den k-Rezeptoren zugeordnet werden (Kosterlitz, H.W. et al., 1981). Die Opioidbindungsstellen im Rattengehirn setzen sich aus etwa 46% μ-, 42% δ- und 12% k-Rezeptoren zusammen (Gillan, M.G.C. und Kosterlitz, H.W., 1982). Am Meerschweinchen Ileum befinden sich in erster Linie μ-Rezeptoren, am Samenstrang der Maus dominieren δ-Rezeptoren und am Samenstrang der Ratte ε-Rezeptoren. Ratten- und Kaninchendünndarm, sowie Neuroblastomazellinien besitzen nur Enkephalinrezep-

toren (Chang, K.-J. und Cuatrecasas, P., 1979; Leslie, F.M. et al., 1980).

Aufgrund der Kreuzreaktivität der Opioidliganden mit mehreren Rezeptoren stellen die an diesen Gewebepräparationen gemessenen Bindungskonstanten (K_D-Werte) immer "Mischwerte" dar. Der Vergleich von K_D- oder anderen Bindungskonstanten wäre nur dann möglich, wenn die Zusammensetzung der Rezeptorpopulationen in verschiedenen Gewebepräparationen identisch wäre.

5.1.5. Bedeutung für die eigene Arbeit

Ziel der Arbeit war, herauszufinden, ob die Insulinsekretion durch Opioide beeinflusst wird und ob die Bindungsdaten einen rezeptorvermittelten Mechanismus erklären können. Eine exakte Zuordnung der gefundenen Bindungsstellen zu bisher beschriebenen Rezeptoren erschien insbesondere aufgrund der Unstimmigkeiten zwischen verschiedenen Autoren und dem Mangel an absolut selektiven Bindungspartnern für die einzelnen Rezeptoren nicht sinnvoll. Daher soll in den folgenden Abschnitten nur zwischen hoch- bzw. niederaffinen Bindungsstellen unterschieden werden.

5.2. Vergleich von Bindungseigenschaften und Insulinsekretionsstudien verschiedener Enkephaline und Morphin an Inseln

5.2.1. Met-Enkephalin

Bei niedrigen Konzentrationen von Met-Enkephalin (10^{-11} bis 10^{-9} M) zeigte sich eine Stimulation der Insulinsekretion in Gegenwart von 16,7 mM Glucose, deren maximaler Effekt, eine Steigerung um ca. 60%, bei 10^{-10} M Met-Enkephalin lag (siehe 4.3.1.). Die Arbeiten von Green, I.C. et al., 1980; 1983 und Hermansen, K., 1983 bestätigen die insulinotrope Wirkung von Met-Enkephalin bei niedrigen Konzentrationen. Auch die prozentuale Erhöhung der Insulinsekretion liegt im gleichen Bereich. Steigerungen um 50-100% wurden für Met-Enkephalin (Green, I.C. et al., 1980; 1983; Nieter, M. und Schatz, H., 1981; Hermansen, K., 1983) sowie auch für andere Opioide (Kanter, R.A. et al., 1980; Pierluissi, P. et al., 1981; Green, I.C. et al., 1983; 1983a) gefunden. Hier muß berücksichtigt werden, daß die Glucosekonzentration auf die Opioidwirkung einen starken Einfluß hat. Wie Abbildung 4.6 zeigt, war bei substimulatorischer Glucosekonzentration (5,0 mM) nur ein sehr schwacher Effekt mit niedrigem Signifikanzniveau ($p < 0,05$) erkennbar. Diese Glucoseabhängigkeit der Met-Enkephalin-Wirkung wurde auch für andere Opioide beschrieben. Der in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration beobachtete insulinotrope Effekt war bei substimulatorischer Glucosekonzentration nicht mehr nachzuweisen (Ipp, I.C. et al., 1978; Pierluissi, P. et al., 1981; Green, I.C. et al., 1983). Eine direkte Korrelation der Opioidwirkung von der Glucosekonzentration zeigte Hermansen,

K., 1983 bei Untersuchungen am isolierten Hundepankreas: je höher die eingesetzte Glucosekonzentration war, desto stärker war die Wirkung von Met-Enkephalin auf die Insulinsekretion.
Wenn der sekretionssteigernde Effekt rezeptorvermittelt ist, so sollte in diesem Bereich eine geringfügige Änderung der Konzentration an Ligand, in diesem Fall Met-Enkephalin einen großen Unterschied im Besetzungsgrad des Rezeptors bewirken.

Die Verdrängungskurve (Abb. 4.2) zeigt, daß mit Met-Enkephalin-Konzentrationen, die kleiner als 10^{-9} M sind, eine starke Verdrängung des radioaktiv markierten, spezifisch gebundenen Met-Enkephalins erfolgt. Bei Erhöhung der Met-Enkephalin-Konzentration auf 10^{-8} M zeigt sich keine weitere Verdrängung von ^{3}H-Met-Enkephalin aus der Bindung, die Kurve besitzt dort ein Plateau, bei dem noch ca. 50% des ^{3}H-Met-Enkephalins spezifisch gebunden sind. Daraus kann man schließen, daß Langerhanssche Inseln der Ratte einen Rezeptor für Met-Enkephalin haben, dessen Dissoziationskonstante (K_D-Wert) kleiner als 10^{-9} M ist. Eine genauere Abschätzung des K_D-Werts war nicht möglich, da schon die eingesetzte, radioaktive ^{3}H-Met-Enkephalin-Konzentration aus technischen Gründen 10^{-9} M betrug und somit eine Erfassung der Bindungscharakteristik des Rezeptors bei Met-Enkephalin-Konzentration < 10^{-9} M nicht zuließ.
Der Vergleich mit der Literatur , soweit möglich, zeigt, daß die Dissoziationskonstante des hochaffinen Rezeptors für Met-Enkephalin an Langerhansschen Inseln der Ratte mit den K_D-Werten, die an anderen Organen gefunden wurden, übereinstimmen: die angegebenen K_D-Werte schwanken zwischen 0,7 nM, gemessen am Meer-

schweinchen-Gehirn (Waterfield, A.A. et al., 1979) und 2 nM, gemessen an Gehirnmembranen der Ratte (Simantov, R. et al., 1978; Chang, K.-J. und Cuatrecasas, P., 1979) (Tab. 5.1).

Verfolgt man die Insulinsekretionskurve (Abb. 4.6) bei höheren Met-Enkephalin-Konzentrationen (16,7 mM Glucose), so nimmt die Steigerung der Insulinsekretion wieder ab, erreicht bei 10^{-8} M den Wert der Kontrolle (kein Zusatz von Met-Enkephalin) und liegt bei weiterer Erhöhung der Met-Enkephalin-Konzentration sogar niedriger. Met-Enkephalin hemmt also bei Konzentrationen größer als 10^{-8} M die Insulinsekretion in Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen. Bei 5,0 mM Glucose zeigte sich auch bei höheren Met-Enkephalin-Konzentrationen praktisch kein Effekt auf die Insulinsekretion.

Die Daten stehen in Einklang mit der bisher in der Literatur berichteten Hemmung der Insulinsekretion bei höheren Met-Enkephalin-Konzentrationen (Kanter, R.A. et al., 1980), wobei die bisherigen Widersprüche - teilweise wurden hemmende (Kanter, R.A. et al., 1980), teilweise stimulierende (Ipp, E. et al., 1978; Green, I.C. et al., 1980; 1983; Hermansen, K., 1983) Effekte gefunden - durch die konzentrationsabhängige Wirkung des Enkephalins auf die Insulinsekretion gelöst werden konnten.

Der Befund einer dualen Wirkung, daß ein Opioid sowohl hemmende wie stimulatorische Wirkung auf den gleichen Parameter haben kann, zeigte sich auch bei der Messung der Somatostatinsekretion (Schusdziarra, V. et al., 1983), der Glucagonsekretion (Ipp, E. et al., 1978) und bei Bestimmungen der c-AMP-Konzentration (Green, I.C. et al., 1983).

Es muß nun gefragt werden, ob der hemmende Effekt auch von Rezeptoren übertragen wird. Der hochaffine Rezeptor kommt dafür nicht in Frage, da er bei diesen Met-Enkephalin-Konzentrationen schon gesättigt ist. Außerdem erscheint es unwahrscheinlich, daß ein Rezeptor gleichzeitig stimulierende wie hemmende Effekte übertragen soll. Wesentlich plausibler erscheint die Postulierung eines zweiten, niederaffinen Rezeptors, der, wie in Abschnitt 5.1. beschrieben, für die Opioide an vielen Geweben gefunden wurde. Dieser Rezeptor soll dann die Hemmwirkung des Met-Enkephalins bei höheren Konzentrationen übertragen. Da der Besetzungsgrad des Rezeptors bei niedrigen Konzentrationen sehr gering ist, spielt er bei geringen Met-Enkephalin-Konzentrationen keine Rolle.

Die Verdrängungskurve läßt nur mit einiger Übung einen zweiten Rezeptor erkennen. Dies ist zu vermuten, da selbst bei Met-Enkephalin-Konzentrationen über 10^{-8} M noch ca. 40% ^{3}H-Met-Enkephalin spezifisch gebunden sind. Wesentlich leichter läßt sich diese Information der Sättigungskurve (Abb. 5.1) entnehmen, die aus der Verdrängungskurve nach untenstehender Formel (Verspohl, E.J., 1981), berechnet wurde:

$$dpm_{berechnet} = dpm_{gemessen} \times \frac{\text{Mol unmark. MEK + Mol mark. MEK}}{\text{Mol mark. MEK}}$$

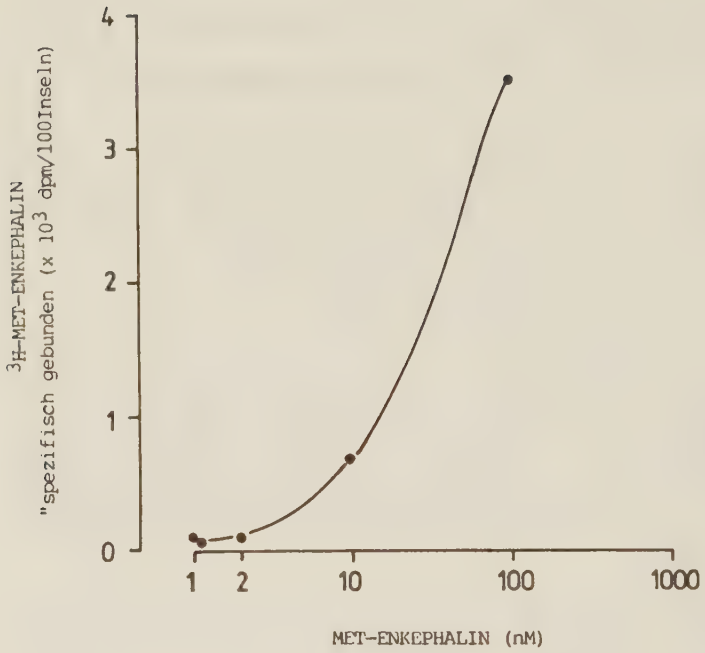

Abb. 5.1: "spezifisch gebundenes" ^{3}H-Met-Enkephalin in Abhängigkeit von der Met-Enkephalin-Konzentration

Zusammenfassend läßt sich bisher feststellen, daß an Langerhansschen Inseln der Ratte zwei Rezeptoren für Met-Enkephalin, ein hoch- und ein niederaffiner, gefunden wurden, wobei dem hochaffinen Rezeptor die Übertragung der insulinotropen Wirkung, dem niederaffinen die Hemmwirkung des Met-Enkephalins bei höherer Konzentration zugeordnet werden kann. Met-Enkephalin hat nur bei stimulatorischer Glucosekonzentration einen deutlichen Einfluß auf die Insulinsekretion.

5.2.2. Leu-Enkephalin

In Übereinstimmung mit Met-Enkephalin zeigte auch Leu-Enkephalin, wie aus Abbildung 4.7 zu ersehen ist, einen von der Glucosekonzentration abhängigen, stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion. Dieser lag in dem Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis < 10^{-7} M und besaß bei 10^{-8} M sein Maximum. Hier bewirkte Leu-Enkephalin eine etwa 65%ige Insulinsekretionssteigerung gegenüber der nur durch Glucose (16,7 mM) induzierten Insulinfreisetzung der Kontrollinseln, was sich mit der für Met-Enkephalin und andere Opioide gemessenen Wirkungsstärke deckt (Abschnitt 5.2.1). Vergleicht man die Konzentrationsbereiche, in denen die insulinotrope Wirkung beider Enkephaline nachzuweisen war, zeigt sich, daß höhere Konzentrationen an Leu-Enkephalin benötigt wurden, um denselben stimulierenden Effekt zu erzeugen: Die Konzentration für die maximale Wirkung von Met-Enkephalin (10^{-10} M) lag um zwei 10er Potenzen unter der von Leu-Enkephalin (10^{-8} M).

Untersuchungen über die Beeinflussung der Insulinsekretion am isolierten perfundierten Hundepankreas zeigten, daß Leu-Enkephalin obwohl in der gleichen Konzentration eingesetzt, bei der Met-Enkephalin sein Wirkungsmaximum besaß, eine wesentlich schwächere Wirkung hatte (Hermansen, K., 1983). Am perfundierten Rattenmagen fanden Mc Intosh et al., 1983, daß die GIP (gastric-inhibitory-polypeptide) - stimulierte Somatostatinfreisetzung durch Met-Enkephalin bereits bei einer Konzentration von 4 x 10^{-9} M um 50% gehemmt wird, wogegen Leu-Enkephalin die gleiche Wirkung erst bei 3,8 x 10^{-8} M besitzt.

Aufgrund dieser Befunde kann festgehalten werden, daß hier Met-

Enkephalin gegenüber Leu-Enkephalin insofern das "wirksamere" Opioid darstellt, als es bereits in 1 bis 2 Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentrationen den gleichen maximalen Effekt erreicht.

Betrachtet man den Verlauf der Insulinsekretionskurve bei höheren Leu-Enkephalin-Konzentrationen, so nimmt die Steigerung der Insulinsekretion in Gegenwart von mehr als 10^{-8} M Leu-Enkephalin wieder ab und erreicht bei Konzentration 10^{-7} M das Ausgangsniveau. Eine weitere Erhöhung der Leu-Enkephalin-Konzentration bis 10^{-6} M bewirkt einen gegenläufigen Effekt, die Hemmung der Insulinfreisetzung um etwa 30% ($p < 0,02$) gegenüber der Kontrollkonzentration (nur 16,7 mM Glucose ohne Leu-Enkephalin-Zusatz). Befunde von Kanter, R.A. et al., 1980 bestätigen die konzentrationsabhängige hemmende Wirkung von Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin in diesem Bereich. Wie beim stimulierenden Effekt so lag auch hier die Hemmwirkung von Met-Enkephalin bei Konzentration 10^{-7} M wiederum unterhalb der von Leu-Enkephalin bei Konzentration $> 10^{-6}$ M.

Es kann somit, was das Leu-Enkephalin betrifft, folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1.) Leu-Enkephalin in Analogie zu Met-Enkephalin übt einen dualen Effekt auf die glucoseinduzierte (16,7 mM) Insulinsekretion der Langerhansschen Inseln der Ratte aus. 2.) Beide Effekte spielen sich für Leu-Enkephalin gegenüber Met-Enkephalin in einem 10 bis 100fach höheren Konzentrationsbereich ab.

Aus Rezeptoruntersuchungen an Gehirnhomogenaten (Wüster, M. et al., 1981; Waterfield, A.A. et al., 1979) und pharmakologischen

Testungen an isolierten Organpräparationen war bereits bekannt, daß dort Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin ihre Effekte über den gleichen Rezeptor ausüben. Um die Bindungseigenschaften beider Peptide zu erfassen, wurde bei den Rezeptorstudien wiederum tritiummarkiertes Met-Enkephalin eingesetzt. Mit Hilfe von Verdrängungsstudien sollte nun die Aussage möglich sein, ob Leu-Enkephalin an den mit ^{3}H-Met-Enkephalin besetzten Rezeptor bindet und wenn ja, ob auch hier der biologische Effekt mit den Bindungsdaten in Übereinstimmung gebracht werden kann. Weiterhin sollte eine Aussage über die Affinitäten beider Enkephaline zur Met-Enkephalin-besetzten Bindungsstelle zu machen sein.

Der Verdrängungskurve (Abb. 4.3) ist zu entnehmen, daß das gebundene tritiummarkierte Met-Enkephalin durch Leu-Enkephalin verdrängt wird. Dies zeigt, daß auch Leu-Enkephalin an den von Met-Enkephalin besetzten Rezeptor bindet. Eine deutliche Verdrängung erfolgt erst ab Konzentration über 10^{-8} M. Wie bei der Verdrängungskurve von ^{3}H-Met-Enkephalin durch Met-Enkephalin, führt die weitere Erhöhung der Leu-Enkephalin-Konzentration auf 10^{-7} M bzw. 10^{-6} M zu keiner vollständigen Verdrängung von spezifisch gebundenem ^{3}H-Met-Enkephalin. Da zur Ermittlung der unspezifischen Bindung mit 10^{-4} M Leu-Enkephalin verdrängt wurde, dieser Wert also definitionsgemäß auf der Abszisse liegt, kann ^{3}H-Met-Enkephalin auch aus seiner niederaffinen Bindungsstelle durch Leu-Enkephalin verdrängt werden.

Der Vergleich der Met-Enkephalin-Verdrängungskurve (Abb.4.2) mit der Leu-Enkephalin-Verdrängungskurve (Abb. 4.3) zeigt eine Verdrängung von ^{3}H-Met-Enkephalin durch Leu-Enkephalin erst bei

höheren Konzentrationen als durch Met-Enkephalin was mit einer geringeren Bindungsaffinität von Leu-Enkephalin gleichbedeutend ist.

Da die Insulinsekretionskurve bei Leu-Enkephalin ebenfalls zu höheren Konzentrationen verschoben ist, liegt es nahe, daß Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin ihre Wirkung agonistisch auf die Insulinsekretion über die gleichen Rezeptoren ausüben. Die Verschiebung der Verdrängungskurve mit Leu-Enkephalin zu höheren Konzentrationen - maximale Verdrängung des hochaffin gebundenen ^{3}H-Met-Enkephalins bei 10^{-7} M - im Vergleich zur größten Steigerung der Insulinsekretion durch Leu-Enkephalin (10^{-8} M) wird durch die höhere Affinität des zu verdrängenden ^{3}H-Met-Enkephalins im Vergleich zu Leu-Enkephalin erklärt.

Vergleichbare Ergebnisse an einem anderen System fanden Waterfield, A.A. et al., 1979. Die von dieser Arbeitsgruppe am Meerschweinchen-Gehirn ermittelten K_D-Werte für beide Enkephaline lagen für Met-Enkephalin sowohl bei der hochaffinen als auch bei der niederaffinen Bindungsstelle niedriger als für Leu-Enkephalin (Tab. 5.1).

5.2.3. DAMME (proteolysestabiles Met-Enkephalinanalogon)

Das dritte der untersuchten Enkephaline unterscheidet sich in sofern von den beiden anderen, als es sich hier um ein synthetisches Enkephalinanalogon handelt. DAMME entsteht durch chemische Veränderung der Met-Enkephalinstruktur. Ersatz der Aminosäure $Glycin^2$ durch D-Alanin, Methylierung der Amingruppe von Phenylalanin und Reduktion der terminalen Carboxylgruppe zum Alkohol, sollen das Peptid gegen enzymatischen Abbau resistent machen. Wie aus der Literatur bekannt ist, zeigen synthetische, in ihrer Struktur modifizierte Enkephalinanaloga im Vergleich zu den natürlichen Peptiden ein verändertes Bindungsverhalten (Leslie, F.M. et al., 1979; Kosterlitz, H.W. et al., 1980; Wüster, M. et al., 1981). Auch in den eigenen Versuchen verhielt sich DAMME anders als Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin.

5.2.3.1. Interpretation der Bindungs- und Sekretionsdaten von DAMME

Der Verdrängungskurve von DAMME Abbildung 4.4 läßt sich zunächst entnehmen, daß auch DAMME an den von Met-Enkephalin besetzten Rezeptor bindet. Schon bei sehr niedriger Konzentration von 10^{-11} M verdrängt es ca 50% des spezifisch gebundenen ^3H-Met-Enkephalins. Im weiteren Verlauf der Verdrängungskurve ist mit Erhöhung der DAMME-Konzentration von 10^{-10} M auf 10^{-7} M keine wesentliche weitere Verdrängung von ^3H-Met-Enkephalin durch DAMME festzustellen. Im Vergleich zu den beiden anderen Enkephalinen scheint DAMME zu der mit Met-Enkephalin besetzten hochaffinen Bindungsstelle die größere Affinität zu besitzen, denn es bindet

hier bereits bei geringeren Konzentrationen als Leu-Enkephalin und scheint auch gegenüber Met-Enkephalin die größere Affinität zu haben.

Zu erwarten wäre, daß auch DAMME, wie für Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin beschrieben, in ähnlicher Weise Einfluß auf die Insulinfreisetzung ausübt.

Bei der Betrachtung der Insulinsekretionskurve fällt auf, daß DAMME über einen breiten Konzentrationsbereich, 10^{-11} M bis 10^{-7} M, zu einer nur geringfügigen Erhöhung ($p < 0,05$) der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt.

Aus den bisher erläuterten Befunden kann festgestellt werden, daß trotz der großen Affinität, die DAMME gegenüber der hochaffinen Bindungsstelle zeigte, ein nur sehr schwacher biologischer Effekt im niedrigen Konzentrationsbereich bei stimulatorischer Glucose vermittelt wurde.

Um Wirkung und Bindungsverhalten von DAMME zu erklären, sollen zunächst die Begriffe "Agonist", "Antagonist" und "Partialagonist" erläutert werden: Liganden, die an einen Rezeptor binden und eine maximal mögliche Wirkung ("intrinsic activity") vermitteln, werden als Agonisten, Liganden, die trotz Besetzung aller Rezeptoren nur eine Teilwirkung (submaximale Wirkung) auslösen als Partialagonisten bezeichnet. Bindet ein Ligand mit hoher Affinität an einen Rezeptor ohne eine "intrinsic activity" auszulösen, handelt es sich um einen Antagonisten. Agonisten, Partialagonisten und Antagonisten können demnach nur über den Vergleich von Rezeptorbindung und Folgewirkung unterschieden werden (Smith, E.L. et al., 1983).

Vergleicht man nun die Effekte von Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin mit denen von DAMME läßt sich folgendes beobachten: der stimulierende Effekt der beiden Enkephaline bei niedrigen Konzentrationen bis 10^{-8} M (Leu-Enkephalin) wird von DAMME, trotz voller Rezeptorbesetzung durch eine geringe Erhöhung der Insulinsekretion wiedergegeben. Projiziert auf die oben erläuterten Begriffe könnte die von DAMME, durch Bindung an den hochaffinen Rezeptor ausgelöste schwache Sekretionssteigerung, als partialagonistische Wirkung gedeutet werden.

5.2.4. Morphin

Der am besten zu charakterisierende Rezeptor ist der μ-Rezeptor, da für ihn Morphin als selektiver Bindungspartner und Naloxon als relativ spezifischer Antagonist zur Verfügung stehen.

Wie aus Abb. 4.9. zu entnehmen ist, bleibt die Insulinsekretion von Morphin in einem Konzentrationsbereich von 10^{-11} M bis 10^{-6} M in Gegenwart stimulatorischer (16,7 mM) Glucose unbeeinflusst. In dem Konzentrationsbereich von 10^{-9} M bis 10^{-6} M und substimulatorischer (5,0 mM) Glucose zeigte sich ebenfalls keine Beeinflussung der Insulinsekretion durch Morphin. Auch Naloxon beeinflusst die Insulinfreisetzung bei Konzentration 10^{-6} M nicht. Dies steht in Einklang mit den Daten von Nieter, M. und Schatz, H., 1981 und Hermansen, K., 1983, die ebenfalls keinen Eigeneffekt von Naloxon feststellen konnten. Ebenso blieben Naloxon (10^{-6} M) + Morphin (10^{-11} M - 10^{-6} M) ohne Einfluß auf die glucosestimulierte (16,7 mM) Insulinfreisetzung.

Die Sättigungskurve (Abb. 4.5) zeigt die spezifische Bindung von

^{3}H-Morphin im Bereich von 10^{-9} M bis 2,5 x 10^{-7} M. Da durch gebundenes Morphin keine Beeinflussung der Insulinsekretion erfolgte, handelt es sich um Rezeptoren, deren Besetzungsgrad keinen Einfluß auf die Freisetzung von Insulin hat. Die geringe spezifische Aktivität von ^{3}H-Morphin verhinderte die Erstellung von Verdrängungs- oder Sättigungskurven im wichtigen, niedrigen Konzentrationsbereich. Da Morphin bei diesen Konzentrationen auch keine Wirkung auf die Insulinsekretion zeigte, wurde auf die Verwendung höhermarkierten Morphins verzichtet.

Diese Ergebnisse zeigen, daß μ-Rezeptoren für die Sekretion von Insulin an isolierten Langerhansschen-Inseln der Ratte im untersuchten Konzentrationsbereich keine Rolle spielen.

5.3. Wirkungsmechanismus: direkter oder indirekter (Somatostatin-vermittelter) Effekt der Enkephaline auf die Insulinsekretion

Wie unter 5.2.1. und 5.2.2. beschrieben, ist die sekretionssteigernde Wirkung der beiden Enkephaline, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin auf die Insulinfreisetzung Langerhansscher-Inseln der Ratte rezeptorvermittelt. Da die Rezeptorstudien nicht an B-Zellen sondern an isolierten Inseln gemacht wurden, konnte über die genaue Lokalisation der Opioidbindungsstellen und damit über den Wirkungsmechanismus keine Aussage gemacht werden.
Es gibt zwei Möglichkeiten, wie Opioide zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung an isolierten Inseln führen können:
1. Eine direkte Beeinflussung der B-Zellsekretion:
das würde bedeuten, daß die Enkephaline an Opioidrezeptoren der B-Zelle binden, wodurch ein Signal in die Zelle übermittelt wird, das eine Steigerung der Insulinfreisetzung bewirkt.
2. Sie könnten indirekt zu einer Erhöhung der B-Zellsekretion führen, indem die Somatostatinsekretion durch Besetzung von Opioidbindungsstellen der D-Zellen gehemmt wird. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, daß Opioide die Freisetzung von Somatostatin am perfundierten Hundepankreas und Rattenmagen verringern (siehe 1.3.5.2.). Da Somatostatin eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von Insulin ausübt, kommt es durch eine reduzierte Sekretion von Somatostatin aus der D-Zelle zu einer indirekten Erhöhung der Insulinsekretion (siehe 1.3.4.2.). Damit könnten theoretisch Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin auch an der isolierten Insel über eine Hemmung von Somatostatin die Insulinsekretion steigern. Um dies zu klären, wurde wie in Ab-

schnitt 4.4. beschrieben, der Einfluß von Somatostatin auf die Insulinsekretion durch Entleerung der Somatostatinspeicher mittels Cysteamin ausgeschaltet und untersucht, ob die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion durch Met-Enkephalin dadurch aufgehoben wird.

Tabelle 4.11 zeigt, daß der Einfluß von Met-Enkephalin auf die Insulinfreisetzung durch die Cysteaminvorbehandlung nicht aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der modulierende Effekt der Enkephaline auf die Insulinsekretion nicht indirekt über Rezeptoren der Somatostatin enthaltenden D-Zellen vermittelt wird. Auch Green, I.C. et al., 1983a fanden eine Steigerung der Insulinsekretion isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte durch Dynorphin, die nicht somatostatinvermittelt war.

5.4. Physiologische Bedeutung der Enkephaline für die Insulinsekretion

Die gemessenen Plasmaspiegel von Met-Enkephalin betragen beim Menschen $2,5 \times 10^{-11}$ M - $2,5 \times 10^{-10}$ M (Clement-Jones, V. et al., 1980; Roda, L.G. et al., 1983) und liegen damit in einem Bereich, der zur konzentrationsabhängigen Stimulierung der Insulinsekretion führte. Dies trifft auch für Leu-Enkephalin zu, das erst bei höheren Konzentrationen wirksam war: die Konzentration im Rattenplasma und im Perfusat des Rattenpankreas wurden unter basalen Glucosekonzentrationen mit ca. $1,4 \times 10^{-9}$ M ermittelt (Sachse, G. und Laube, H., 1980; Sachse, G. et al., 1981). Ob der bei höheren

Enkephalinkonzentrationen einsetzende, gegenteilige Einfluß auf die Insulinsekretion physiologische Bedeutung hat, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden, da die lokalen Konzentrationen der Enkephaline an den endokrinen Zellen des Pankreas unbekannt sind. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß diese Konzentrationen höher sein können als die Plasmaspiegelwerte, da im Pankreasgewebe und Inselzellen Opioide nachgewiesen werden konnten (siehe 1.3.2.) und diese auch aus dem perfundierten Pankreas sezerniert werden (1.3.2.c), wie von Sachse, G. und Mitarbeitern gezeigt werden konnte (Sachse, G. et al., 1981).

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Enkephaline und Morphin die Insulinsekretion isolierter Langerhansscher-Inseln der Ratte über spezifische Opioidrezeptoren beeinflussen und ob die modulierende Wirkung der Enkephaline auf eine Hemmung der Somatostatinfreisetzung aus den D-Zellen zurückzuführen ist.

6.2. Ergebnisse und Schlußfolgerungen

1. Met-Enkephalin übt, in Abhängigkeit von seiner Konzentration, eine duale Wirkung auf die glucoseinduzierte (16,7 mM) Insulinsekretion aus: in einem Konzentrationsbereich von 10^{-11} M bis 10^{-9} M mit einem Wirkungsmaximum bei 10^{-10} M stimulierte es die Insulinfreisetzung. Konzentrationen über 10^{-9} M führten zu einer Hemmung der Stimulation.
Beide Effekte können den Opioidrezeptoren für Met-Enkephalin an Langerhansschen-Inseln der Ratte zugeordnet werden, wobei dem hochaffinen ($K_D < 10^{-9}$ M) die insulinotrope Wirkung, dem niederaffinen die Hemmwirkung des Met-Enkephalins bei höheren Konzentrationen zukommt.

2. Auch Leu-Enkephalin stimuliert in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose bei niedrigen Konzentrationen (10^{-9} M bis kleiner 10^{-7} M) die Insulinsekretion und hemmt in höheren Konzentrationen (> 10^{-7}

M). Es bindet an die gleichen Rezeptoren wie Met-Enkephalin, jedoch mit geringerer Affinität. Die Übertragung der stimulierenden Wirkung von Leu-Enkephalin kann, wie bei Met-Enkephalin, durch Bindung an den hochaffinen, die der hemmenden Wirkung durch Bindung an den niederaffinen Rezeptor erklärt werden.

3. Trotz großer Affinität zu dem von ^{3}H-Met-Enkephalin besetzten Rezeptor, bewirkt DAMME über einen breiten Konzentrationsbereich hinweg (10^{-11} M - 10^{-7} M) eine nur schwache Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

4. Morphin beeinflußt die Insulinsekretion in einem Konzentrationsbereich von 10^{-11} M - 10^{-6} M nicht. Dies zeigt, daß μ-Rezeptoren für die Sekretion von Insulin an isolierten Langerhansschen-Inseln der Ratte in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-11} M bis 10^{-6} M keine Rolle spielen.

5. Die stimulierende Wirkung von Met-Enkephalin bleibt auch nach Entleerung der Somatostatinspeicher mit Cysteamin erhalten. Dies spricht gegen eine indirekte Beeinflussung der Insulinsekretion durch die Enkephaline über die Hemmung der Somatostatinfreisetzung aus D-Zellen.

6. Schlußfolgerungen

Die beiden Opioidpeptide, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, modulieren die glucoseinduzierte Insulinsekretion der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte. Ihre stimulierende Wirkung kann dem für beide Enkephaline gefundenen hochaffinen Rezeptor, die Hemmwirkung dem niederaffinen Rezeptor zugeordnet werden. Die fehlenden Effekte von Morphin auf die Insulinfreisetzung deuten

darauf hin, daß μ-Rezeptoren für die Sekretion von Insulin an Langerhansschen Inseln der Ratte keine Rolle spielen.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Ahren, B., Böttcher, G., Hakanson, R., Lundquist, I., Sundler, F. (1984)
Cysteamine and the endocrine pancreas in the mouse.
Diabetologia 27, Abstract 4

Alberti, K.G.M.M., Christensen, N.J., Christensen, S.E., Hansen, A.P., Iversen, J., Lundbaek, K., Seyer-Hansen, K., Orskov, H. (1973)
Inhibition of insulin secretion by somatostatin.
Lancet 2, 1299-1301

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976)
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Arx von, E., Faupel, M., Brugger, M. (1976)
Das 4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan Reagens (TDM).
Journal of Chromatography 120, 224-228

Barnard, E.A., Demoliou-Mason, C. (1983)
Molecular properties of opioid receptors.
Brit. Med. Bull. 39, 1, 37-45

Bloom, F.E. (1983)
The endorphins: a growing family of pharmacologically pertinent peptides.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 151-170

Blume, H. (1982)
Endorphine und Enkephaline - körpereigene Modellsubstanzen für Therapeutika der Zukunft?
Pharmaz. Ztg. 41, 2203-2213

Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F. (1979)
Novel opioid peptides derived from casein (ß-casomorphins).
I. Isolation from bovine casein peptone.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1211-1216

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R. (1973)
Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone.
Science 179, 77

Bruni, J.F., Watkins, W.B., Yen, S.S.C. (1979)
ß-endorphin in the human pancreas.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49, 649-651

Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1979)
Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity.
J. Biol. Chem. 254, 8, 2610-2618

Chavkin, C., James, J.F., Goldstein, A. (1982)
Dynorphin is a specific endogenous ligand of the k opioid receptor.
Science 215, 413-415

Chung, A.C., Goldstein, A. (1976)
Failure of hypophysektomy to alter brain content of opioid peptides (endorphins).
Life Science 19, 1005-1006

Clement-Jones, V., Lowry, P.J., Rees, L.H., Besser, G.M. (1980)
Met-enkephalin circulates in human plasma.
Nature 283, 295-297

Corbett, A.D., Paterson, S.J., McKnight, A.T., Magnan, J., Kosterlitz, H.W. (1982)
Dynorphin(1-8) and dynorphin(1-9) are ligands for the k subtype of opiate receptor.
Nature 299, 79-81

Cox, B.M. (1982)
Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology.
Life Sci. 31, 1645-1658

David, M., Moisand, C., Meunier, J.-C., Morgat, J.-L., Gacel, G., Roques, B.P. (1982)
^{3}H-Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr: a specific probe for the opiate receptor subtype in the brain membranes.
Eur. J. Pharmacol. 78, 385-387

Del Pozo, E., van Graffenried, B., Brownell, J., Derres, F., Marbach, P. (1980)
Endocrine effect of a methionine-enkephalin derivative (FK 33-824) in man.
Hormone Res. 13, 90-97

El-Salhy, M., Grimelius, L. (1981)
Immunohistochemical localization of gastrin C-terminus, gastric inhibitory peptide (GIP) and endorphin in the pancreas of lizards with special reference to the hibernation period.
Regulatory Peptides 2, 97-111

Feldberg, W., Shaligram, S.V. (1972)
The hyperglycaemic effect of morphine.
Br. J. Pharmacol. 46, 602-618

Feldberg, W., Gupta, K.P. (1974)
Morphine hyperglycaemia.

J. Physiol. 238, 487-502

Feurle, G.E., Helmstaedter, V., Weber, U. (1982)
Met- and leu-enkephalin immuno- and bio-reactivity in human stomach and pancreas.
Life Sci. 31, 2961-2969

Fujimoto, W.Y., Kawazu, S., Ikeuchi, M., Kanazawa, Y. (1983)
In vitro paracrine regulation of islet B-cell function by A and D cells.
Life Sci. 32, 16, 1873-1878

Fujita, Y., Anemiya, H., Matoba, K., Yajima, Y., Yamamoto, N. (1984)
Is cysteamine a specific depletor of pancreatic somatostatin?
Diabetes Abstract Band Juni/Juli, 584

Gerich, J.E., Lovinger, R., Grodsky, G.M. (1975)
Inhibition by somatostatin of glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas in response to arginine, isoproterenol and theophyllin: evidence for a preferential effect on glucagon secretion.
Endocrinology 96, 3, 749-754

Gilchrist, N., Bolton,J.E., Donald, R.A., Livesey, J.H., Roud, H.K., Nicholls, M.G. (1983)
Hormonal effects and metabolic clearance rate of the enkephalin analogue DAMME in man.
Br. J. Clin. Pharmac. 16, 465-469

Gillan, M.G.C., Kosterlitz, H.W. (1982)
Spectrum of the μ-, δ- und k-binding sites in homogenates of rat brain.
Br. J. Pharmacol. 77, 461-469

Giugliano, D. (1984)
Morphine, opioid peptides, and pancreatic islet function.
Diabetes Care 7, 1, 92-98

Giugliano, D., Ceriello, A., Di Pinto, P., Saccomanno, F., Gentile, S., Cappiapnoti, F. (1982)
Impaired insulin secretion in human diabetes mellitus. The effect of naloxone-induced opiate receptor blockade.
Diabetes 31, 367-370

Green, I.C., Perrin, D., Pedley, K.C., Leslie, R.D.G., Pyke, D.A. (1980)
Effect of enkephalins and morphine on insulin secretion from isolated rat islets.
Diabetologia 19, 158-161

Green, I.C., Ray, K., Perrin, D., (1981)
Effects of opioid peptides on islet c-AMP.
Diabetologia 21, 277

Green, I.C., Ray, K., Perrin, D. (1983)
Opioid peptide effects on insulin release and c-AMP in islets of Langerhans.
Horm. metabol. Res. 15, 124-128

Green, I.C., Perrin, D., Penman, E., Yaseen, A., Ray, K., Howell, S.L. (1983 a)
Effect of dynorphin on insulin and somatostatin secretion, calcium uptake, and c-AMP levels in isolated rat islets of Langerhans.
Diabetes 32, 685-690

Grube, D., Voigt, K.H., Weber, E. (1978)
Pancreatic glucagon cells contain endorphinlike immunoreactivity.
Histochem. 59, 75-79

Grube, D., Forssman, W.G. (1979)
Morphology and function of the enteroendocrine cells.
Horm. Metab. Res. 11, 589-606

Grube, D., Weber, E. (1979)
Corticotropin-lipotropin related peptides in the GEP-endocrine system of rat, dog and man.
In: gut peptides, ed. by Miyoshi, A.
Biomedical Press, Tokyo and Amsterdam, 249-257

Gubler, U., Seeburg, P., Hoffman, B.J., Gage, L.P., Udenfried, S. (1982)
Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides.
Nature 295, 206-208

Guilleman, R., Gerich, J.E. (1976)
Somatostatin: physiologic and clinical significance.
Ann. Rev. Med. 27, 379-388

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Hermansen, K. (1983)
Enkephalins and the secretion of pancreatic somatostatin and insulin in the dog: studies in vitro.
Endocrinology 113, 3, 1149-1154

Hertzberg, E.L., Lawrence, T.S., Gilula, N.B. (1981)
Gap junctional communication.
Ann. Rev. Physiol. 43, 479-491

Höltje, H.-D., (1982)
Zum Verständnis der molekularen Wirkungsmechanismen.
Pharmaz. Ztg. 51, 2808-2813

Honey, R.N., Arimura, A., Weir, G.C. (1981)
Somatostatin neutralization stimulates glucagon and insulin secretion from the avian pancreas.
Endocrinology 109, 6, 1971-1974

Hook, V.Y.H., Eiden, L.E., Brownstein, M.J., (1982)
A carboxypeptidase processing enzyme for enkephalin precursors.
Nature 295, 341-342

Horn, A.S., Rodgers, J.R. (1977)
The enkephalins and opiates: structure-activity relations.
J. Pharm. Pharmacol. 29, 257-265

Houck, J.C., Chang, C.M., Kimball, C.D. (1981)
Pancreatic beta-endorphin-like polypeptides.
Pharmacol. 23, 14-23

Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R. (1975)
Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonistic activity.
Nature 258, 577-579

Hughes, J., Beaumont, A., Fuentes, J.A., Malfroy, B., Unsworth, C. (1980)
Opioid peptides: aspects of their origin, release and metabolism.
J. exp. Biol. 89, 239-255

Ipp, E., Dobbs, R., Unger, R.H. (1978)
Morphine and ß-endorphin influence the secretion of the endocrine pancreas.
Nature 276, 190-191

Jeanrenaud, X., Maeder, E., Del Pozo, E., Felber, J.P. (1983)
Effect of an enkephalin-analogue (FK 33-824) on glucose tolerance in man.
Acta Endocrinol. 104, 85-90

Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S. (1982)
Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β-neo-endorphin/dynorphin precursor.
Nature 298, 245-249

Kanatsuka, A., Makino, H., Matsushima, Y., Osegawa, M., Kasanuki, I., Miyahira, ., Yamamoto, M., Kumagai, A. (1981)
Effect of glucose on somatostatin secretion from isolated pancreatic islets of normal and streptozotocin diabetic rats.
Endocrinology 109, 2, 652-657

Kanatsuka, A., Makino, H., Osegawa, M., Kasanuki, J.,Suzuki, T., Yoshida, S., Horie, H. (1984)
Is somatostatin a true local inhibitory regulator of insulin secretion?
Diabetes 33, 510-515

Kanter, R.A., Ensick, J.W., Fujimoto, W.Y. (1980)
Disparate effects of enkephalin and morphine upon insulin and glucagon secretion by islet cell cultures.
Diabetes 29, 84-86

Koerker, D.J., Ruch, W., Chideckel, E., Palmer, J., Gooder, C.J., Ensick, J., Gale, C.C. (1974)
Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas.
Science 184, 482

Konturek, S.J. (1980)
Opiates and the gastrointestinal tract.
Amer. J. Gastroenterology 74, 285-291

Kosterlitz, H.W., Lord, J.A.H., Paterson, S.J., Waterfield, A.A. (1980)
Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with μ- and δ-receptors.
Br. J. Pharmac. 68, 333-342

Kosterlitz, H.W., Paterson, S.J., Robson, L.E. (1981)
Characterization of the k-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain
Br. J. Pharmac. 73, 939-949

Kromer, W., Skworonek, B., Stark, H., Netz, S. (1983)
Modulation of acid secretion from enriched guinea pig parietal cells by opioid receptors.
Pharmacol. 27, 298-304

Kuo, W.N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F. (1973)
Adenylate cyclase in islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 248, 2705-2711

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Larsson, L.-I. (1977)
Coricotropin-like peptides in the central nerves and in the endocrine cells of gut and pancreas.
Lancet 2, 1321-1323

Larsson, L.-I. (1979)
Innervation of the pancreas by substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and gastric/CCK immunoreactive nerves.
J. Histochem. and Cytochem. 27, 9, 1283-1284

Larsson, L.-I., Rehfeld, J.F. (1979)
Peptidergic and adrenergic innervation of pancreatic ganglia.
Scand. J. Gastroent. 14, 433-437

Leslie, R.D.G., Pyke, D.A., Stubbs, W.A. (1979)
Sensitivity to enkephalin as a cause of non-insulin-dependent diabetes.
Lancet 1, 341-343

Leslie, F.M., Chavkin, C., Cox, B.M. (1980)
Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214, 395-402

Lewis, R. V., Stern, A.S. (1983)
Biosynthesis of the enkephalins and enkephalin-containing polypeptides.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 353-372

Li, C.H., Tseng, L.-F., Ferraro, P., Yamashiro, D. (1980)
ß-endorphin: dissociation of receptor binding activity from analgesic potency.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 2303-2304

Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J., Kosterlitz, H.W. (1977).
Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors.
Nature 267, 495-499

Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., Gilbert, P.E. (1976)
The effects of morphine- and nalorphinelike drugs in nondependent chronic spinal dog.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 197, 517-532

Mason, J.S., Heber, D. (1982)
Endogenous opiates modulate insulin secretion in flushing non-insulindependent diabetes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 693-697

Mc Intosh, C.H.S., Kwok, Y.N., Mordhorst, T., Nishimura, E., Pederson, R.A., Brown, J.C. (1983)
Enkephalinergic control of somatostatin secretion from the perfused rat stomach.
Can. J. physiol. Pharmacol. 61, 657-663

Morley, J.E., Baranetsky, N.G., Wingert, T.D., Carlson, H.E., Hershman, J.M., Melmed, S., Levin, S.R., Jamison, K.R., Weitzman, R., Chang, R.J., Varner, A.A. (1980)
Endocrine effects of naloxone-induced opiate receptor blockade.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 50, 251-257

Morley, J.S. (1983)
Chemistry of opioid peptides.
Brit. Med. Bull. 39, 1, 5-10

Nicolas, P., Hammonds, R.G. Jr, Li, C.-H. (1982)
ß-endorphin: opiate receptor binding activities of six naturally occuring ß-endorphin homologs studied by using tritiated human hormone and naloxone as primary ligands-effects of sodium ion
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2191-2193

Nieter, M., Schatz, H. (1981)
Insulotropic action of endorphins and ß-casomorphin, an opioid like peptide fragment of milk casein
Acta Endocrinol. (Copenh.) 97 (Suppl.) 243, 14

Orci, L. (1977)
The islet of Langerhans: a multihormonal micro-organ
in: Insulin and metabolism, ed. by Bajaj, J.S.
Elsevier, Amsterdamn pp 1-11

Pasternak, G.W., Snyder, S.H. (1974)
Opiate receptor binding: effects of enzymatic treatments.
Mol. Pharmacol. 10, 183-193

Pasternak, G.W., Wilson, A.H., Snyder, S.H. (1975)
Differential effects of protein-modifying reagents on receptor binding of opiate agonists and antagonists.
Mol. Pharmacol. 11, 340-351

Pasternak, G.W., Zhang, A.N.-Z., Tecott, L. (1980)
Developmental differences between high and low affinity opiate binding sites: their relationship to analgesia and respiratory depression.
Life Sci. 27, 1185-1190

Pasternak, G.W., Caroll-Buatti, M., Spiegel, U. (1981)
The binding and analgesic properties of a sigma opiate, SKF 10047.
J. Pharmacol. Exp. 219, 192-198

Patel, Y.C., Amherdt, M., Orci, L. (1979)
Somatostatin secretion from monolayer cultures of neonatal rat pancreas.
Endocrinology 104, 3, 676-679

Patel, Y.C., Amherdt, M., Orci, L. (1982)
Quantitative electron microscopic autoradiography of insulin, glucagon and somatostatin binding sites on islets.
Science 217, 1155-1156

Patel, Y.C., Pierzchala, J. (1983)
Depletion of islet somatostatin by cysteamine augments insulin and glucagon secretion.
Program of the 43rd Annual Meeting of the American Diabetes Association, San Antonio, TX, p8A

Paterson, S.J., Robson, L.E., Kosterlitz, H.W. (1983)
Classification of opioid receptors.
Brit. Med. Bull. 39, 1, 31-36

Pert, C.B., Bowie, D.L., Pert, A., Morell, J.L., Gross, E. (1977)
Agonist-antagonist properties of N-allyl-(D-Ala)^2-Met-enkephalin.
Nature 269, 73-74

Petersson, B., Hellerström, C. (1984)
Cysteamine rapidly decreases pancreatic islet somatostatin in vitro.
Diabetologia 27, Abstract 413

Pierluissi, R., Pierluissi, J., Ashcroft, S.J.H. (1981)
Effects of an enkephalinanalogue (DAMME) on insulin release from cultured rat islets of Langerhans.
Diabetologia 20, 642-646

Polak, J.M., Bloom, R.S., Sullivan, S.N., Facer, P., Pearse, A.G.E. (1977)
Enkephalin-like immunoreactivity in the human gastrointestinal tract.
Lancet 1, 972-974

Reid, R.L., Yen, S.S.C. (1981)
ß-endorphin stimulates the secretion of insulin and glucagon in the humans.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 3, 592-594

Robson, L.E., Kosterlitz, H.W. (1979)
Specific protection of the binding sites of D-Ala^2-D-Leu^5-enkephalin (δ-receptors) and dihydromorphine (μ-receptors)
Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 205, 425-432

Roda, L.G., DeMarco, V., Possenti, R. (1983)
Stability of peripheral enkephalins
in: Degradation of endogenous opioids: its relevance in human pathology and therapy.
ed. by Ehrenpreis, S., Sicuteri, F.
Raven Press, New York, pp. 25-41

Rudman, D., Berry, C.J., Riedeburg, Ch. H., Hollins, B.M., Kutner, M.H., Lynn, M.J., Chawala, A.K. (1983)
Effects of opioid peptides and opiate alkaloids on insulin secretion in the rabbit.
Endocrinology 112, 1702-1710

Ryder, S., Gollapudi, G.M., Ryder, D. (1980)
Morphine sulfate inhibits insulin release from isolated, superfused rat pancreatic islets.
Horm. Metab. Res. 12, 412-413

Sachse, G., Laube, H. (1980)
Leucin-enkephalin plasma levels after an oral or intravenous arginine stimulation in rats.
Horm. Metab. Res. 12, 416-417

Sachse, G., Laube, H., Svedberg, J., Breidenbach, Th., Teschemacher, H.J. (1980)
ß-endorphin and leucin-enkephalin levels during stimulation in the isolated perfused rat pancreas.
Diabetologia 19, 311

Sachse, G., Svedberg, J., Laube, H. (1981)
Effect of glucose and arginine on l.-enkephalin secretion of the isolated perfused rat pancreas.
Horm. Metab. Res. 13, 360

Sachse, G., Laube, H.,Svedberg J., Breidenbach, Th., Teschemacher, H.J. (1981a)
Opiates influence endocrine pancreas secretion.
Diabetologia 21, 322, Abstract 444

Samols, E., Marri, G., Marks, V. (1965)
Promotion of insulin secretion by glucagon.
Lancet 2, 415-416

Sanchez-Franco, F., Patel, Y.C., Reichlin, S. (1981)
Immunoreactive adrenocorticotropin in the gastrointestinal tract and pancreatic islets of the rat.
Endocrinology 108, 2235-2238

Schatz, H., Kullek, U. (1980)
Studies on the local (paracrine) actions of glucagon, somatostatin and insulin in the isolated islets of rat pancreas.
FEBS Lett. 122, 2, 207-209

Schultzberg, M., Lundberg, J., Hökfelt, T., Terenius, L., Brandt, J., Eide, R.R., Goldstein, M. (1978)
Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla.
Neuroscience 3, 1169-1186

Schusdziarra,V., Specht, J., Schick, R., De la Fuente, A., Holland, A., Pfeiffer, E.F. (1983)
Effect of morphine, leu-enkephalin and ß-casomorphins on basal somatostatin release in dogs.
Horm. metabol. Res. 15, 407-408

Schusdziarra, V., Schick, A., de la Fuente, A., Specht, J., Klier, M., Brantl, V., Pfeiffer, E.F. (1983 a)
Effect of ß-casomorphins and analoga on insulin release in dogs.
Endocrinology 112, 3, 885-889

Schwartz, J.C., Malfroy, B., de la Baume, S. (1981)
Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin-dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase.
Life Sci. 29, 1715-1740

Schwartz, J.-C., De la Baume, S., Yi, C.C., Malfroy, B., Chaillet, P., Marcais-Collado, H., Costantin, J. (1983)
Physiological roles of "enkephalinase" (enkephalin dipeptidyl carboxypeptidase) and of bestatin sensitive aminopeptidase in the inactivation of enkephalins.
in: Degradation of endogenous opioids: its relevance in human pathology and therapy, ed. by Ehrenpreis, S., Sicuteri, P.
Raven Press, New York, pp 51-66

Simantov, R., Snyder, S.H. (1976)
Morphine-like peptides leucine-enkephalin and methionine-enkephalin: interactions with the opiate receptor.
Mol. Pharmacol. 12, 987-998

Simantov, R., Childers, S.R., Snyder, S.H. (1978)
The opiate receptor binding interactions of ^{3}H-methionine enkephalin, an opioid peptide.
Eur. J. Pharmacol. 47, 319-331

Simon, E.J. (1981)
Opiate receptors: some recent developments.
TIPS, 155-158

Simon, E.J. (1982)
History
in: Endorphins: chemistry, physiology, pharmacology and chemical relevance, ed. by Malick, J.B., Bell, R.M.S.
Modern pharmacology-toxicology series, 20
Marcel Dekker AG, Basel, pp 1-8

Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, J.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A. (1983)
Principles of biochemistry: mammalian biochemistry 7th edition
Mc Graw-Hill International Book Company, pp 371-392

Smith, J.R., Simon, E.J. (1980)
Selective protection of stereospecific enkephalin and opiate binding against inactivation by N-ethylmaleimide: evidence for two classes of opiate receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 281-284

Soelder, J.S., Slone, D. (1965)
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779

Sorenson, R.L., Grouse, L.H., Elde, R.P. (1983)
Cysteamine blocks somatostatin secretion without altering the course of insulin or glucagon release.
Diabetes 32, 377-379

Stern, A.S., Wurzburger, R.J., Barkey, R., Spector, S. (1982)
Opioid polypeptides in guinea pig pancreas.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 6703-6706

Stubbs, W.A., Jones, A., Edwards, C.R.W., Delitala, G., Jeffcoate, W.J., Ratter, S.J., Besser, G.M., Bloom, S.R., Alberti, K.G.M.M. (1978)
Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man.
Lancet, 1225-1227

Szabo, S., Reichlin, S. (1981)
Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration.
Endocrinology 109, 6, 2255-2257

Taniguchi, H., Utsumi, M, Hasegawa, M., Kobayashi, T., Watanabe, Y., Murakami, K., Seki, M., Tsuton, A, Mackimura, H., Sakada, M., Baba, S., (1977)
Physiologic role of somatostatin.
Diabetes 26, 2, 700-702

Terenius, L., Wahlström, A. (1976)
A method for site selectivity analysis applied to opiate receptors.
Eur. J. Pharmacol. 40, 241-248

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972)
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis, U.S.A., p 146

Verspohl, E.J. (1981)
Nachweis und Charakterisierung von Insulinrezeptoren an der Langerhansschen Insel der Ratte.
Habilitationsschrift

Verspohl, E.J., Händel, M., Hagenloh, I., Ammon, H.P.T. (1982)
In vitro effect of exogenous insulin on insulin secretion. Studies with glucose, leucine, arginine, aminophylline and tolbutamide.
Acta diabet. Lat. 19, 303-317

Waterfield, A.A., Leslie, F.M., Lord, J.A.H., Ling, N., Kosterlitz, H.W. (1979)
Opioid activities of fragments of ß-endorphin and its leucine^{65}-analogue. Comparsion of the binding properties of methionine- and leucine-enkephalin.
Eur. J. Pharmacol. 58, 11-18

Watkins, W.B., Bruni, J.F., Yen, S.S.C. (1980)
ß-endorphin and somatostatin in the pancreatic D-cell. Colocalization by immunocytochemistry.
J. Histochem. Cytochem. 28, 1170-1174

Weber, E., Evans, C.J., Barchas, J. D. (1983)
Multiple endogenous ligands for opioid receptors.
TINS, 333-336

Wolozin, B.L., Pasternak, G.W. (1981)
Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6181-6185

Wüster, M., Schulz, R., Herz, A. (1981)
Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations.
Biochem. Pharmacol. 30, 14, 1883-1887

Zhang, A.N-Z., Pasternak,G.W. (1980)
μ- and -opiate receptors: correlation with high and low affinity opiate binding sites.
Eur. J. Pharmacol. 67, 323-324

Zhang, A.N.-Z., Pasternak, G.W. (1981)
Ontogeny of opioid pharmacology and receptors: high and low affinity site differences.
Eur. J. Pharmacol. 73, 29-40

Zioudrou, Ch., Streaty, R.A., Klee, W.A. (1979)
Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins.
J. Biol. Chem. 254, 7, 2446-2449

L E B E N S L A U F

Ursula Maria Berger

geboren am 11. Mai 1957 in Coburg

Vater: Josef Berger, Angestellter im öffentlichen Dienst

Mutter: Ruth Berger, geb. Rödßus

April 1964 - Juli 1967	Besuch der Grund- und Hauptschule in Schlier Kreis Ravensburg
August 1967 - Juni 1976	Besuch des Welfengymnasiums in Ravensburg
2. Juni 1976	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
September 1976 - Juli 1977	Besuch des Leibniz Kollegs in Tübingen
April 1977	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Tübingen
16. März 1979	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
8. September 1980	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1980 - Oktober 1981	Pharmaziepraktikum in der Central-Apotheke in Ravensburg
23. Oktober 1981	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
9. November 1981	Erteilung der Approbation als Apotheker
Oktober 1981 - Februar 1982	Angestellte der Central-Apotheke in Ravensburg
April 1982	Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut in Tübingen
Seit November 1982	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl Pharmakologie
Dezember 1984	Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren:

E.J. Verspohl (Pharmakologie); H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J. Schultz (Pharmazeutische Chemie); E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie); E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie); E. Lindner (Anorg. Chemie); K. Botzenhart (Medizinische Mikrobiologie); H. Seiler (Physik).